

Aus dem Robert Koch-Institut Berlin
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
Direktor: Professor Dr. med. Hansjürgen Raettig

Unspezifische bakterielle Inhalations- impfung bei Mäusen gegen Influenzavirus-Inhalationsinfektion

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Gerhard Walter
aus Erlangen

1976

Paul von Arnim, Carl-Neuberg-Straße
Abteilung für Hygiene und Infektionskrankheiten
Direktor: Professor Dr. med. Paul von Arnim

Unspezifische bakterienfällende
Impfung bei Mäusen gegen
Influenzaviren - Infektion

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Robert Koch-Institut Berlin
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
Direktor: Professor Dr. med. Hansjürgen Raettig

Unspezifische bakterielle Inhalations- impfung bei Mäusen gegen Influenzavirus-Inhalationsinfektion

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von
Gerhard Walter
aus Erlangen

Referent : Professor Dr.med. Hansjürgen Raettig

Korreferent : Professor Dr.med. Gert Kunkel

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fach-
bereiche der Freien Universität Berlin

Tag der Promotion : 28. 1. 76



INHALTSÜBERSICHT

	Seite
Einleitung	1
Material und Methoden	25
Versuchstiere	25
Impfstoff	25
Immunisierung	26
Impfstoffdosis	27
Virus	28
Infektion	28
Ergebnisse	30
Statistische Sicherung	32
Tabellen	34
Graphische Darstellungen	41
Diskussion	48
Literaturverzeichnis	52

Einleitung

Es ist eine jahrtausende alte Erfahrung, daß Menschen, die eine ansteckende Krankheit durchgemacht haben, sehr selten nochmals an dieser erkranken. Auf dieser Erfahrung basieren die ersten Versuche einer Immunisierung. Von den Chinesen wird berichtet, daß sie prophylaktisch getrockneten und pulverisierten Schorf von Pocken durch die Nase schnupften. Auch von anderen Völkern werden Impfungen mit virulenten Pocken berichtet und schließlich gelang JENNER Ende des 18. Jahrhunderts ein entscheidender Durchbruch mit seinen Kuhpockenexperimenten. Seit der Entdeckung der Mikroben und der von ihnen verursachten Infektionskrankheiten wurden gegen Ende des vorigen Jahrhunderts die wissenschaftlichen Grundlagen der Immunologie geschaffen und die Abwehrmethoden des Körpers gegen die krankheitserregenden Keime von vielen Forschern untersucht. Fast gleichzeitig wurden zwei Abwehrsysteme entdeckt, deren Erforschung unabhängig voneinander durchgeführt wurde und deren komplexes Zusammenwirken erst in jüngster Zeit näher aufgeklärt werden konnte. Zum einen hat METSCHNIKOFFS Entdeckung der Phagozyten dazu geführt, den zellulären Aspekt der Immunität in den Vordergrund zu stellen und den zellulären Mechanismen auch die lokale, organgebundene Abwehr zuzuschreiben und BESREDKA, der Schüler Metschnikoffs entwickelte daraus seine Lehre der Organimmunität, die auf lokalen, zellulären, erst in zweiter Linie die Phagozyten betreffenden Mechanismen beruhen

sollte (2), während zum anderen EHRLICH durch seine Seitenkettentheorie die Grundlagen der humoralen Immunität, die später besonders von von BEHRING weiterentwickelt wurden, entscheidend beeinflusste (15). So entwickelte sich eine sog. deutsche Schule, die mehr den humoralen Aspekt der Immunität betrachtete und eine sog. französische Schule, deren Hauptaugenmerk den lokalen, zellgebundenen Mechanismen galt (43). Dem Aspekt der humoralen Abwehr wurde im weiteren Verlauf der Vorzug gegeben, da BESREDKA seine Theorie der lokalen Immunität nicht ausreichend experimentell begründen konnte, während bei den durch die deutsche Schule bevorzugten parenteralen Impfmethode der Erfolg am Anstieg der spezifischen Antikörper direkt gemessen werden konnte. Trotzdem wurde die weitere Erprobung lokaler Immunisierungsmethoden nicht aufgegeben, da ihre Erfolge unbestreitbar waren und andererseits damals schon nach Impfmethode gesucht wurde, die nicht die oft schweren Nebenwirkungen der parenteralen Immunisierung zeigten. So berichtete YOSHIDA 1909, daß Soldaten der deutschen Schutztruppe sich geweigert hätten, sich parenteral gegen Typhus impfen zu lassen und eher eine Erkrankung in Kauf nahmen als die Krankheitserscheinungen nach der Impfung (87). YOSHIDA konnte in der genannten Arbeit einen weiteren Vorteil der lokalen Immunisierung zeigen: es wurde eine Schutzwirkung gegen einen heterologen Keim sichtbar, während bei parenteraler Impfung diese ausblieb. Auf die unspezifische Wirkung der lokalen Immunisierung möchte ich später näher eingehen.

Da bei parenteraler Immunisierung das Integumentum des Körpers künstlich umgangen wird und dem Organismus keine Möglichkeit gegeben wird, sich primär am Ort des Eindringens mit dem Erreger auseinanderzusetzen, lag der lokalen Immunisierung die Forderung zugrunde, die Eintrittspforte des Erregers, beispielsweise die Darmschleimhaut für Salmonellen durch Antigenkontakt für virulente Keime ungangbar zu machen (84).

LOEFFLER hat 1906 im Tierversuch nachgewiesen, daß Mäuse nach oraler Gabe von abgetöteten *S. typhi murium* gegen eine Infektion mit virulenten *S. typhi murium* geschützt waren (35). Seitdem wurden zahlreiche Versuche über orale Immunisierung durchgeführt und die Ergebnisse LÖFFLERS bestätigt, zuletzt 1961 von RAETTIG (42), der anschließend durch weitere, umfangreiche Experimente die lokale Abwehr des Darmes weiter erforschte (47). Dabei stellte sich auch hier heraus, daß nach oraler Gabe von hitzeinaktivierten Keimen nicht nur ein spezifischer Schutz gegenüber einer oralen homologen Infektion entsteht, sondern auch ein unspezifischer Schutz gegen heterologe Keime (48).

So waren überraschenderweise Mäuse, die oral mit hitzeinaktivierten *S. typhi murium* immunisiert wurden, signifikant geschützt gegen eine orale Infektion mit dem mäusepathogenen Columbia-SK-Virus, obwohl zwischen beiden Keimen keinerlei Antigengemeinschaft besteht (49).

Auch mit dem oral angewendeten Salk-Impfstoff aus inaktivierten

Poliomyelitisviren konnte ein unspezifischer Schutz gegen das Columbia-SK-Virus erzeugt werden (39).

Um die bis dahin fast völlig im Dunkeln liegenden Vorgänge bei der Entwicklung einer Immunität der Schleimhaut erhellen zu können, war es zunächst wichtig, das Schicksal des Antigens nach dem Kontakt mit der Schleimhaut zu verfolgen.

Bis vor nicht allzu langer Zeit hielt man es für undenkbar, daß großkorpuskuläre Partikel ohne Veränderung die Darmschleimhaut durchdringen können, obwohl bereits 1843 HERBST das Gegenteil bewies, indem er 3 Stunden nach Verfütterung von Stärkemehl beim Hund unveränderte Stärkekörner im strömenden Blut und im Ductus thoracicus nachwies (24) und obwohl 1905 von HIRSCH diese Befunde bestätigt wurden (26). Erst durch die Arbeiten VOLKHEIMERS 1959 - 1967 wurde die Tatsache der Resorption großkorpuskulärer Partikel, von VOLKHEIMER Persorption genannt, da die Aufnahme parazellulär erfolgt, allgemein anerkannt (75). VOLKHEIMER und Mitarbeiter hatten in umfangreichen Versuchen an Mensch und Tier Stärkekörner, PVC-Kügelchen, Sporen, Kieselgur, Hefezellen, Quarzsand u.a. in Größenordnungen von 5 bis weit über 100 μ Teilchengröße verfüttert und als oberste Grenze der Persorptionsfähigkeit des menschlichen Darmes eine Teilchengröße von 150 μ mit Hilfe von Quarzsand gefunden. Auffallend war, daß nach Einnahme von Stärkekörnern durch Jugendliche eine typische Persorptionskurve festgestellt wurde, die ein Maximum der Körner im Blut nach 10-12 Minuten, nach 90-120 Minuten und häufig noch ein drittes Maximum

nach 210-240 Minuten aufwies. Ob dieser wellenförmige Verlauf durch Sekretion und erneute Aufnahme der Stärke, ähnlich dem Verhalten von Antigenen (50) verursacht ist, kann aus den vorliegenden Versuchen nicht beurteilt werden.

Ausgehend von diesen Ergebnissen untersuchte RAETTIG zunächst die Durchlässigkeit der Darmwand für Viren am Modell des sich nicht in der Epithelzelle vermehrenden T_3 -Coliphagen, der unverändert die Darmwand passieren kann und wenige Minuten nach Sondenfütterung im Blut der weißen Maus zu finden war (45).

Von größerer Bedeutung war jedoch die Frage, wie sich ein enteropathogenes Virus verhält, das ja von den Epithelzellen aufgenommen wird und sich intrazellulär vermehrt. Auch hier konnte RAETTIG am Beispiel des Columbia-SK-Virus zeigen, daß unabhängig von den Vorgängen im Darmepithel nach wenigen Minuten eine Resorptionsvirämie auftritt, die der eigentlichen Infektionsvirämie vorausgeht und unabhängig von der Pathogenität des Virus und geringfügig abhängig von der oral verabreichten Anzahl der Viren ist (46).

Da man bislang den Dünndarm für den Ort der Resorption von oral gegebenem Virus hielt, unternahm HOFFMANN Tierversuche, bei denen er den T_3 -Coliphagen an verschiedenen Stellen des Intestinaltraktes einbrachte und anschließend das Auftreten im Blut kontrollierte (27). Er machte die überraschende Feststellung, daß umso weniger Tiere phagenpositives Blut aufwiesen, je tiefer er mit der Schlundsonde die Phagen verfütterte. Am niedrigsten war die Resorptionsquote, wenn der Phage direkt in den Magen gegeben wurde. Sehr schnell und

zu einem hohen Prozentsatz wurden die Phagen resorbiert, wenn die Versuchstiere auf einen phagengetränkten Tupfer bissen. Die Annahme, daß ein großer Teil der Phagen bei dieser Applikationsart oberhalb des Magen-Darm-Traktes, das heißt infolge Aspiration über die Schleimhaut des Respirationstraktes aufgenommen wird, konnte durch die 100%ige Virämiequote nach intratrachealer Gabe gestützt werden. Nach HOFFMANN findet in der Mundhöhle und im Ösophagus keine nennenswerte Resorption von Phagen statt. Auffällig an den weiteren Untersuchungen HOFFMANNs war, daß sowohl nach rektaler wie auch nach intratrachealer Gabe nach wenigen Minuten eine hohe Phagenkonzentration im Speichel und in den Speicheldrüsen gefunden wurde, die wohl auf dem Blutwege dorthin gelangt sein mußte. Nach parenteraler Gabe wurde diese Wirkung nicht beobachtet und deshalb schlußfolgerte HOFFMANN, daß die Phagen durch die Schleimhautpassage eine Veränderung ihrer Oberflächenbeschaffenheit erfahren haben mußten, die eventuell durch die von VOSS (75) näher erläuterten Polyelektrolyte der Schleimhaut verursacht worden sein könnte.

Der Befund, daß die Phagen schon kurze Zeit nach der Resorption wieder sekretiert werden veranlaßte SAHM, die Sekretion in den Magen nach intravenöser Gabe zu untersuchen (60). Es konnte bestätigt werden, daß auch nach intravenöser Injektion die Phagen bald, wahrscheinlich ebenso wie bei der Resorption zellulär sekretiert werden und zwar nicht nur über die Magenschleimhaut (und wahrscheinlich auch über die des Darmes), sondern auch über die Schleimhäute und Drüsen im Mundbereich und des Respirationstraktes.

Die Schleimhaut des Atemtraktes scheint eine wichtige Rolle für den weiteren Weg eines lokal aufgenommenen Antigens zu spielen. Da sich das Modell des T_3 -Phagen für die Untersuchung des weiteren Schicksals nach der Resorption und Sekretion nicht eignet, da der Phage im Blut bald inaktiviert wird, wurden von UECKER et al. hitzeinaktivierte, mit P32 markierte *S. typhi murium* verwendet und das weitere Verhalten im Organismus verfolgt (73). Hier konnte gezeigt werden, daß nach oraler, rektaler und subkutaner Gabe das Antigen in Organen mit hoher RES-Aktivität gespeichert wird und daß in Lunge und Speicheldrüsen die gemessene Aktivität über dem Durchschnitt liegt. Die Autoren halten es auf Grund dieser Befunde für möglich, daß das Antigen nach oraler und rektaler Impfung nach der Resorption wieder sekretiert wird vor allem über Respirationstrakt und Speichel, in Anlehnung an den von RAETTIG bereits 1965 postulierten Kreislauf der Antigene (50). Demnach soll ein Teil des aufgenommenen Antigens durch die Zellen der biologischen Abwehr abgefangen und spezifisch verarbeitet werden, ein anderer Teil mit Kot und Urin ausgeschieden werden und immunologisch verloren gehen, während ein dritter Teil nach der Resorption über den Blutweg zur Schleimhaut des Respirationstraktes und zu den Speicheldrüsen gelangt, wo er wieder sekretiert, verschluckt und erneut über den Intestinaltrakt aufgenommen wird. Dieser Kreislauf der Antigene sei unabhängig vom primären Ort der Antigenaufnahme.

Auch die Frage der Aufnahme von lebendem bakteriellem Antigen konnte geklärt werden (63). Am Beispiel von lebenden Staphylokokken und *S. typhi murium* konnten ähnliche Ergebnisse erbracht werden wie bei

lebenden Viren. Aus den genannten Arbeiten geht also eindeutig hervor, daß ein Teil des über die Schleimhaut gegebenen Antigens unabhängig von den biologischen Leistungen der Epithelzelle in die Blutbahn übertritt und von dort wieder sekretiert wird, wobei den Schleimhäuten des Respirationstraktes eine besondere Rolle zuzukommen scheint. Weiterhin müssen Antigene, die unverändert die Schleimhaut passiert haben, zwangsläufig mit dem allgemeinen Immunapparat in Berührung kommen und eine serologische Reaktion auslösen. Jedoch sind die früheren Ergebnisse über eine Antikörperbildung im Serum nach lokaler Immunisierung widersprüchlich (43) und keinesfalls traten Serumantikörper in dem Maße auf, daß sie die beobachtete Schutzwirkung hätten erklären können. Deshalb war es notwendig, die Serumantwort nach lokaler Immunisierung näher zu untersuchen.

RAETTIG und BUSE haben vergleichend Mäuse entweder oral oder subkutan mit inaktivierten *S. typhi murium* immunisiert und in verschiedenen Zeitabständen den Antikörpertiter im Serum mit Hilfe der Hämagglutinationsmethode gemessen (52). Sie kamen zu dem Ergebnis, daß bei beiden Impfmethoden ein ähnlicher Anstieg und Abfall der Serumantikörper stattfindet, wobei der Antikörpertiter nach parenteraler Impfung 2 bis 3 Mal höher ist als nach oraler Antigenzufuhr. Entscheidend aber ist die Tatsache, daß die oral immunisierten Tiere zu einem Zeitpunkt, zu dem kaum noch Antikörper im Serum nachweisbar waren, mit einem schnellen, hohen und lang anhaltenden Antikörpertiter reagierten, wenn sie mit virulentem *S. typhi murium* infiziert wurden. Auch LIETZ hatte diese Beobachtung bei der oralen

Immunisierung mit inaktivierten Dyspepsiecolibakterien und nachfolgender intraperitonealer Infektion mit den virulenten Keimen gemacht (34). Daraus ließ sich die Schlußfolgerung ziehen, daß für die lokale Immunisierung nicht die Höhe des Serumantikörpertiters zum Zeitpunkt der Infektion ein Gradmesser des spezifischen Schutzes sei, sondern die Bereitschaft immunkompetenter Zellen, im Bedarfsfalle schnell Antikörper zu produzieren. Diese Bereitschaft konnte noch nach 257 Tagen nach der lokalen Immunisierung der Maus nachgewiesen werden, was in diesem Fall die Hälfte des Lebens ausmacht (53). Es ist deshalb der Befund nicht überraschend, daß die sekundäre Immunreaktion nach oraler Immunisierung sich nicht von der nach parenteraler Immunisierung unterscheidet (31). Nachdem nun gezeigt werden konnte, daß Antigene über die Schleimhäute unverändert persorbiert werden, eine humorale Serumantwort auslösen und über die Schleimhäute wieder sekretiert werden, wobei zu vermuten ist, daß der durch Resorptions- und Sekretionsmechanismen entstehende Kreislauf dem Organismus mehr Gelegenheit zur weiteren Auseinandersetzung mit dem Antigen gibt, stellt sich als nächstes die Frage, was in der Schleimhaut mit dem Teil des Antigens geschieht, der nicht bis in die Blutbahn persorbiert wird und der sicher zum Aufbau einer lokalen Immunität beiträgt bzw. lokale Mechanismen überhaupt auslöst.

Bereits im Jahre 1922 hatte DAVIES bei der Suche nach diagnostischen Möglichkeiten der Dysenterie Antikörper im Stuhl gefunden (9). 1963 haben FRETER et al. die im menschlichen Stuhl vorkommenden

Antikörper, die sog. Koproantikörper, die in früheren Versuchen eine Schutzwirkung gegen Cholera bewirkten (7), untersucht und kamen zu dem Schluß, daß diese lokal im Darm gebildet werden müßten (17,18). RAUSS und KETTYI konnten zeigen, daß die Koproantikörper sich in ihrer Bildung und Dynamik von den Serumantikörpern unterscheiden (57). Zur etwa gleichen Zeit entdeckten TOMASI und ZIGELBAUM, daß in bestimmten Sekreten an Immunglobulinen hauptsächlich IgA vorkommen, die sich von denen des Serums unterscheiden (71). Dieses sekretorische IgA wurde in der Folgezeit von vielen Arbeitsgruppen untersucht und wir wissen heute, daß es eine hervorragende Bedeutung für die Entwicklung der lokalen Immunität besitzt und, was den Darm betrifft, identisch ist mit den Koproantikörpern. Es kommt im Gastrointestinaltrakt ebenso vor wie im Respirationstrakt, in der Tränenflüssigkeit, im Urogenitaltrakt, im Speichel, im Colostrum usw. Die Struktur und Bildung ist heute weitgehend aufgeklärt: IgA wird in den in der Lamina propria vorhandenen Plasmazellen und Lymphozyten gebildet und in den Epithelzellen mit Hilfe des "Transportstückes" oder "secretory piece" (auch sekretorische Komponente genannt) zum Dimer gekoppelt (83). Die Verbindung mit der sekretorischen Komponente verleiht dem IgA eine größere Beständigkeit gegenüber proteolytischen Fermenten, die in den Sekreten reichlich vorhanden sind bzw. von eingedrungenen Mikroorganismen gebildet werden. Die Stimulierung der sekretorischen IgA-Produktion erfolgt fast ausschließlich durch lokalen Antigenkontakt, wobei man annehmen kann, daß der Teil des Antigens, der primär in die Lamina

propria gelangt hauptsächlich dafür verantwortlich ist und nur zum geringen Teil das in die Blutbahn persorbierte und wieder sekretierte Antigen die lokalen IgA-Mechanismen in Gang setzt. Allerdings könnte durch die Sekretion des Antigens die Tatsache, daß nach parenteraler Immunisierung sekretorische IgA, wenn auch in geringerer Menge gefunden wurde, erklärt werden (76).

Aus den genannten Arbeiten kann man schließen, daß ein Teil des lokal zugeführten Antigens durch Persorptionsvorgänge nicht bis in die Blutbahn, sondern "nur" bis in die Lamina propria der Schleimhaut gelangt und dort die spezifische sekretorische IgA-Produktion auslöst. Der in die Blutbahn aufgenommene Teil löst zum einen eine serologische Antwort aus und zum anderen stimuliert er bei der Sekretion die lokale Schleimhautimmunität, repräsentiert durch das sekretorische IgA, nicht nur am Ort der primären Antigenzufuhr, sondern auch in anderen Schleimhäuten. Dies könnte auch die Befunde erklären, bei denen nach Inhalationsimmunisierung eine Immunität der Darmschleimhaut beobachtet wurde (38).

Obwohl in allen Sekreten ganz überwiegend Immunglobuline vom IgA-Typ Träger der lokalen Abwehr sind, kommen dort auch IgM und IgG vor, deren Funktion aber bis heute noch weitgehend unaufgeklärt ist. WERNER et al. konnten einen eigenartigen biphasischen Verlauf vom Auftreten von IgM-produzierenden Zellen in der Darmschleimhaut nach oraler Immunisierung beobachten (85). Da nach intravenöser Impfung nur am 7. Tag IgM-produzierende

Zellen im Darm auftraten, nach oraler Immunisierung jedoch am 7. und am 18. Tag, vermuten die Verfasser, daß es zwei Systeme von IgM-bildenden Zellen im Darm gebe, eines, das der allgemeinen Immunabwehr, ein anderes, das nur dem Immunapparat des Darmes zugehörig sei. FERNALD et al. vertreten die Ansicht, daß das lokal gebildete IgM in der Schleimhaut eine immunologische Gewebsbarriere darstelle und wegen seiner Größe das Epithel nicht durchdringen kann und deshalb am Bildungsort verbleibe (17).

Die Schleimhaut der Luftwege erweckte schon frühzeitig das Interesse der Immunologen, da sie ein primär empfängliches Organ für viele Krankheitserreger ist. So war vor allem die lokale Immunisierung gegen Diphtherie mittels Inhalation oder Nasensalbe erfolgreich (3,12).

SANARELLI ließ Kaninchen Meningokokken inhalieren und stellte im Serum höhere Antikörpertiter fest als nach anderen Impfmethoden (60). EGUCHI verglich die Wirkung der oralen und inhalativen Immunisierung von jungen und alten Mäusen und Meerschweinchen mit inaktivierten Pneumokokken, wobei die Inhalationsimpfung gegen eine Infektion mit der 100fach tödlichen Dosis des virulenten Keimes schützte (14). Diese wenigen Beispiele zeigen die Wirksamkeit dieser Impfmethode und lassen auch hier die Frage nach dem Schicksal des inhalierten Antigens auftauchen.

SCHIEBLE hat an Ratten und Meerschweinchen das Verhalten im Organismus von verschieden gelösten Substanzen nach etwa 30min. Inhalation geprüft und dabei der Ablagerung im Tracheobronchial-

baum und im Alveolarraum, der Resorption, der Deponierung in der Lunge, dem Abtransport über das Blut- und Lymphsystem u.a.m. besondere Aufmerksamkeit geschenkt (62). Demnach erfolgt die Resorption von echt und kolloidal gelösten Teilchen im Tracheobronchialbaum interzellulär, in den Alveolen jedoch überwiegt die intrazelluläre, durch Phagozytose bewirkte Aufnahme. Eine Deponierung der inhalierten Substanzen war noch Stunden bis Tage danach sowohl in Form einer zellulären Speicherung in den Alveolarepithelien und in Zellen des RES der Lymphknoten als auch in Form freier Ablagerung in der Schleimschicht, Bindegewebsspalten und Lymphräumen nachweisbar.

Der Abtransport geht nach SCHIEBLE sowohl hämatogen als auch lymphogen vor sich, wobei der doppelten Lungenpassage der lymphogen über den Ductus thoracicus abtransportierten Teilchen besondere Bedeutung zukommen müsse. Für den hämatogenen Abtransport bestehen beste Bedingungen und was beispielsweise bei inhalierten Medikamenten die Schnelligkeit des Wirkungseintrittes anbelange, sei die Inhalation einer intravenösen Injektion vergleichbar.

Eine weitere wichtige Frage bezüglich der Resorption ist die nach der Größe der inhalierten Teilchen. Untersuchungen hatten ergeben, daß umsomehr Teilchen bis zu den Lungenalveolen vordringen, je kleiner sie sind (5). Aerosole von einer durchschnittlichen Teilchengröße von 2μ gelangen sowohl beim Menschen als auch beim Versuchstier bis zu den Alveolen (36).

Daß der Respirationstrakt über eine hervorragende Resorptionsfähigkeit verfügt, wurde auch in den bereits erwähnten Versuchen HOFFMANNS deutlich, da dort die Virämiequote nach intratrachealer Gabe des T₃-Phagen 100% betrug, nach oraler Fütterung nur 60% (27).

Die Entwicklung einer lokalen Immunität kann nach all den bis dahin veröffentlichten Ergebnissen als bewiesen angesehen werden, unklar aber blieb die Frage, ob jedes Organ, bzw. jede einem Organ zugehörige Schleimhaut, ihre eigene Immunität entwickelt wie BESREDKA es annahm oder ob, auf welchem Weg auch immer, generell die Schleimhäute an diesem Immunisierungsgeschehen teilnehmen können. So hat bereits 1925 SANARELLI den Versuch unternommen, Kaninchen gegen Typhus, Cholera und Dysenterie durch Einblasen des Impfstoffes in beide Nasenöffnungen zu immunisieren (61). SCHMUDDE impfte weiße Mäuse vergleichend oral, rektal und nasal mit hitzeinaktivierten *S. typhi murium*-Bakterien und wies im Infektionsbelastungsversuch nach, daß die nasale Immunisierung bei oraler Infektion der oralen Impfung ebenbürtig ist (64).

Auch bei der vergleichenden Impfung mit inaktiviertem Polio-myelitisvirus konnte NEUMANN-SCHÖNWETTER bei der nasalen Immunisierung einen statistisch signifikanten Schutz gegen orale Infektion erzielen (39). MARWIK schließlich hat durch zehnmalige Inhalation von inaktivierten *S. typhi murium*-Bakterien, täglich eine Stunde lang, einen guten Impfschutz der weißen Maus gegen die orale Infektionsbelastung aufgezeigt und ein Optimum dieses

Impfschutzes zwischen dem 5. und 20. Tag ermittelt (38). Diese Beispiele mögen genügen, um zu zeigen, daß durch den Antigenkontakt der Schleimhaut die lokale Immunität sich nicht allein auf den Ort der primären Antigenzufuhr beschränkt.

Die Schleimhaut des Respirationstraktes hat in der letzten Zeit besonderes Interesse für die Immunisierung gegen das Influenzavirus gefunden, da sie sehr empfänglich für dieses Virus ist. Da das Influenzavirus zytotoxisch für das Flimmerepithel ist und dadurch der Weg für bakterielle Superinfektionen gebahnt wird (die ja letztendlich die Hauptursache für die hohe Mortalität bei Epidemien darstellen) (6) und andererseits, wenn überhaupt, nur kurzfristig eine Virämie auftritt, ist es für die Wirksamkeit einer Impfung von ausschlaggebender Bedeutung, eine ausreichende Antikörperkonzentration an den oberflächlichen Zellen des Respirationstraktes zu erreichen. Dies kann einmal dadurch erfolgen, daß der Antikörpertiter im Blut hoch ist oder aber daß lokal Antikörper gebildet werden (28). Dabei muß man jedoch berücksichtigen, daß zwar bei genügend hohem Serumantikörperspiegel ein Übertritt in die Schleimhaut und deren Sekret erfolgt, diese Antikörper aber der IgG-Klasse angehören und nicht so widerstandsfähig gegenüber Proteasen sind wie die sekretorischen IgA. WALDMAN et al. konnten an Freiwilligen zeigen, daß in der Bronchoalveolarspülflüssigkeit das IgG:IgA-Verhältnis nach parenteraler Impfung gegen Influenzavirus 2,5:1 beträgt, während es im Nasensekret 1:3 aufwies. Die Autoren machen dafür die höhere Proteasenaktivität im oberen Respirationstrakt ver-

antwortlich, sodaß dort das IgG weitgehend zerstört wird (82). Dies läßt den Schluß zu, daß in tieferen Abschnitten des Respirationstraktes dem aus dem Serum übergetretenen IgG noch eine bedeutende Rolle als neutralisierender Antikörper zukommen könnte. Es gibt auch Hinweise dafür, daß IgG lokal im Atemtrakt gebildet werden kann, jedoch ist nicht bekannt, welche besondere Bedeutung diesem zukommt (33,82).

Die parenterale Grippeschutzimpfung, die heute weltweit praktiziert wird, ist aus mehreren Gründen umstritten: Das Influenzavirus, vor allem das beim Menschen zumeist vorkommende vom Typ A neigt auffallend zu Antigenvariationen (28) und fast regelmäßig entstehen in festen Zeitabständen neue Subtypen, sodaß das Virus den neuesten Impfstoffen im Durchschnitt ein Jahr voraus ist (40). Exakt nachprüfbare Beweise für die Wirksamkeit der Impfung liegen wenig vor und die Erfassung eines Antikörperanstieges im Serum ist nicht in jedem Falle gleichzusetzen mit einer Schutzwirkung. Ein weiteres Problem der Impfung sind die zwar seltenen, manchmal aber schwerwiegenden Nebenwirkungen und die Gefahr der Provokation einer Infektion bei bereits inkubierten Patienten, was besonders bei den durchgeführten Massensimpfungen zu berücksichtigen ist.

Da das Influenzavirus, wie erwähnt, seine pathogene Wirkung auf der Schleimhaut entfaltet, bietet sich die lokale Immunisierung förmlich an. Bereits 1950 wurde beobachtet, daß eine Resistenz gegen eine Influenzavirus-Infektion bei der Maus unabhängig von den Serumantikörpern, aber in strenger Korrelation mit den im Respirationstrakt gefundenen Antikörpern auftrat (16). WALDMAN und Mit-

arbeiter immunisierten Freiwillige vergleichend subkutan und über den Atemtrakt mit inaktiviertem Influenzavirus und stellten bei der mittels Aerosol geimpften Gruppe sowohl einen signifikant besseren Impfschutz als auch das Fehlen jeglicher Nebenwirkungen fest (81). Auch während einer Influenzaepidemie 1967/68 konnte der Erfolg einer lokalen Impfung mittels Aerosol aufgezeigt werden (77). In einer anderen Untersuchung wurden von 12 Freiwilligen 6 subkutan und 6 über den Respirationstrakt geimpft und bei beiden Gruppen ähnliche Antikörperkonzentrationen in den Sekreten gefunden, jedoch persistierten diese in der "respiratorischen Gruppe" länger (76). Das Phänomen, daß auch nach parenteraler Immunisierung Antikörper in den Sekreten auftreten, erklären die Autoren damit, daß entweder Serumantikörper übertreten oder aber das im Blut kreisende Antigen auch den lokalen Immunapparat der Schleimhaut erreicht und diesen stimuliert. Diese letztere Möglichkeit ist in Anbetracht der Tatsache der Sekretion von Antigen nach parenteraler Gabe sehr wahrscheinlich. Jedoch konnte in anderen Arbeiten immer wieder gezeigt werden, daß durch lokale Impfung hauptsächlich die lokale Antikörperproduktion stimuliert wird und bei parenteraler Immunisierung die Serumantikörper (37,76,78,80).

Auch die zelluläre Immunantwort verhält sich analog der humoralen Antwort, d.h. abhängig von der Art der Immunisierung (80). Sie ist jedoch unabhängig von der humoralen Antwort und zeigt ein zeitlich verschiedenes Auftreten.

Daß die lokalen Abwehrmechanismen, in erster Linie das sekretorische

IgA, eine Influenzavirus-Infektion ohne jegliche Serumantikörper abwehren können, bewiesen MANW et al. in einer Untersuchung mit Freiwilligen, denen nasal Influenzavirus verabreicht wurde (37). Von den 12 Versuchspersonen hatten 3 weder einen Anstieg der Serumantikörper zu verzeichnen noch wurden sie krank, jedoch zeigten 2 von ihnen im Sputum einen hohen Anstieg von sekretorischem IgA. Die sekretorischen IgA-Antikörper scheinen auch weniger spezifisch als die Serumantikörper vom IgG-Typ zu sein, da sie im Sputum und Nasensekret auch gegen heterologe Keime wirksam sind (79). Interessant in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, daß andere Autoren beim Hund einen nichtspezifischen, die Hämagglutinationsaktivität von Influenzaviren hemmenden Faktor fanden, der vor der Immunisierung schon vorhanden war und in den Tracheasekreten höher war als im Serum, sich jedoch von den Immunglobulinen unterscheidet (33).

Es sind viele Arbeiten veröffentlicht worden, die als wichtigen Vorteil der lokalen Immunisierung die relativ unspezifische Wirkung dieser Methode beweisen, jedoch gibt es wenige Arbeiten über das komplexe Zusammenwirken der verschiedenen Faktoren der unspezifischen Abwehr. Von den einzelnen unspezifischen Faktoren sind die Phagozytose, Lysozym und Interferon für die vorliegende Arbeit von Bedeutung.

Interferon, 1957 von ISAAK und LINDEMANN entdeckt, wird von virusinfizierten Zellen gebildet und spielt wohl bei der Sofort-

abwehr eine wichtige Rolle. Patienten mit Hypogammaglobulinämie, die eine verminderte Resistenz gegenüber bakteriellen Infekten aufweisen, können Virusinfekte in physiologischer Weise abwehren, was wohl dem Interferonmechanismus zuzuschreiben sein dürfte (68). In der letzten Zeit wurden viele sog. Interferoninduktoren gefunden, wobei neben Viren auch Bakterien diese Eigenschaft aufweisen. So gilt z.B. das Newcastle disease Virus als sehr starker Interferoninduktor, aber auch *S. typhi murium*, *B. abortus* oder Endotoxin von *E. coli* führen nach intravenöser Injektion zu hohen Plasmainterferonspiegeln, die im zeitlichen Auftreten abhängig sind von der Art des Antigens (70). DEGRÉ et al. spritzten sog. Standard Bacterial Vaccine (SBV), welche Staphylokokken, Streptokokken, *Hämophilus influenza*, Klebsiellen und Neisserien enthält, weißen Mäusen intraperitoneal und untersuchten sowohl den Interferontiter im Serum als auch die Schutzwirkung im Mortalitätsversuch (10). Der Interferonspiegel im Plasma erreichte ein Maximum 4 Stunden nach der Injektion und fiel danach wieder ab. Im Mortalitätsversuch zeigte sich eine signifikante Schutzwirkung gegen eine 3 Stunden nach der Injektion von SBV gesetzte intranasale Infektion von Vesicular Stomatitis Virus.

Auch eine Infektion durch Influenzavirus, die durch ein besonderes Modell der Ansteckung von Maus zu Maus den natürlichen Bedingungen weitgehend angepaßt wurde, konnte durch vorherige Gabe eines Interferoninduktors günstig beeinflußt werden, wobei noch hohe Interferontiter in der Lunge gefunden wurden (58).

Die Bildung von Interferon stellt sicher einen wichtigen unspezifischen Abwehrmechanismus gegen Virusinfektionen dar, es ist jedoch problematisch, diesen zum Zwecke der Immunisierung zu stimulieren, da der Interferontiter nur kurzfristig ausreichende Höhe erreicht und sich nicht boostern läßt.

Die wohl zentrale Rolle bei der unspezifischen Abwehr dürfte die Phagozytose spielen, die den Anfang des Mechanismus darstellt, der letztendlich zu einer Immunantwort führt. Die wichtigste Funktion erfüllen dabei die Makrophagen, da sie sowohl für die Antigenaufnahme als auch deren weitere Verarbeitung unentbehrlich sind (65). Die Phagozytosefähigkeit der Makrophagen läßt sich durch parenteralen Antigenreiz steigern, wobei sich diese Fähigkeit nicht allein auf den zur Immunisierung verwendeten Keim erstreckt, sondern es werden auch andere Keime dann verstärkt phagozytiert. SCHULZE konnte den Nachweis erbringen, daß auch nach oraler Immunisierung bei zehnfach höherer Antigendosis die Phagozytosesteigerung der Peritonealmakrophagen genauso groß ist wie nach parenteraler Antigenezufuhr und daß in beiden Fällen die Wirkung gegenüber dem heterologen Keim etwas besser ist als gegenüber dem homologen (65). Die Steigerung der Phagozytoserate setzt schon nach der ersten lokalen Immunisierung ein, erreicht einen Gipfel zwischen dem 11. und 15. Tag und fällt dann langsam bis zum Erreichen der Normalwerte am 36. Tag ab (66).

Auch bei den Alveolarmakrophagen konnte nach Inhalation von *S. typhimurium* und Streptokokken eine Steigerung der Phagozytose und ein

Hinweis auf eine bessere Wirkung gegenüber dem heterologen Keim gefunden werden (29).

Die oben erwähnten Arbeiten erstrecken sich auf die Phagozytose von bakteriellen Keimen. Daß auch Viren phagozytiert werden, ist sicher. Da sich jedoch Viren nur intrazellulär vermehren, tun sie dies auch innerhalb der Makrophagen, was für viele Viren in vitro nachgewiesen wurde (21). Die Vermehrungsvorgänge innerhalb der Makrophagen werden jedoch stark reduziert bei immunisierten Tieren. SHAYEGANI et al. beschrieben, daß sich das Influenza-virus in den Peritonealmakrophagen unbehandelter Mäuse vermehren kann, jedoch nach spezifischer Immunisierung und nach Behandlung mit einem bakteriellen System zur Induktion und Provokation der Abwehr sich eine Resistenz der Makrophagen einstellt und die Vermehrung des Virus stark eingeschränkt wird. Die Schutzwirkung der Behandlung mit dem bakteriellen System konnte auch an der längeren Überlebenszeit von mit Influenzavirus infizierten Mäusen gezeigt werden, wobei die Tiere, die das System lokal mittels Aerosol bekamen, etwas besser als die subkutan immunisierten Tiere geschützt waren (67). Ähnlich diesen Versuchen konnte auch ein unspezifischer Schutz gegen Vacciniavirus durch das gleiche bakterielle System erzeugt werden (1).

Die Phagozytose selbst wird wiederum durch die Opsonisierung wesentlich beeinflußt. Durch Opsonine wird die Oberfläche der Keime so verändert, daß die Phagozytose erleichtert wird. Als Opsonine wirken spezifische Antikörper, das Komplementsystem mit oder ohne Antikörperbeteiligung, das Properdinsystem und verschiedene andere

Stoffe mit phagozytosesteigernder Wirkung, z.B. Histione oder basische Proteine (41). Zu den letztgenannten zählt auch Lysozym, das neben der opsonisierenden Wirkung für sich allein vor allem gramnegative Bakterien völlig auflösen kann. Es scheint ihm ebenfalls eine virustatische Wirkung zuzukommen (22). An der weißen Maus konnte eine lysozymbedingte Verkürzung der Virämiedauer nach intraperitonealer Verabreichung eines Influenzavirus-Lysozym-Gemisches beobachtet werden (23).

Wenn auch über die unspezifischen Mechanismen zur Zeit noch wenig Klarheit besteht, da auch hier zahlreiche, noch wenig bekannte Einzelfaktoren zu einem komplexen Ganzen zusammenwirken, so scheint doch die zentrale Rolle der Phagozytose zuzukommen, da verschiedene Faktoren, die ganz bestimmte Wirksamkeiten entfalten, letztendlich auch die Phagozytose beeinflussen, wie am Beispiel der Opsonine und des Lysozym deutlich ist.

Für die Ausbildung einer lokalen, unspezifischen Immunität scheint jedoch auch das sekretorische IgA eine gewisse Rolle zu spielen. Wie bereits erwähnt, fanden WALDMAN und Mitarbeiter nach parentaler Influenzaschutzimpfung im Serum nur spezifische Antikörper, während nach lokaler Immunisierung im Sputum und Nasensekret auch Antikörper gegen heterologe Keime gefunden wurden (78).

FUKUI et al. fanden eine Hemmung von bakterieller Neuraminidase, Hyaluronidase, Chondroitinsulfatase, Diphtherietoxin und Streptolysin O durch IgA im Speichel (20). HEREMANS und VAERMAN vermuten, daß das IgA in den Schleimhäuten durch die Bildung stabiler

und nicht resorbierbarer Komplexe mit dem Antigen das Eindringen der Keime verhindern (25). Dies könnte eine unspezifische Wirkung haben.

Daß durch lokale Immunisierung ein belastbarer unspezifischer Impfschutz zu erzielen ist, wurde bereits erwähnt (48,49). Ein optimaler Impfschutz könnte jedoch erreicht werden durch Methoden, die sowohl die unspezifischen Abwehrmechanismen stimulieren als auch eine möglichst breitgefächerte, gegen eine Vielzahl von pathogenen Keimen gerichtete spezifische Immunantwort hervorrufen. Dies könnte erreicht werden durch einen Impfstoff, der lokal angewendet wird und polyvalent ist. So befindet sich seit einigen Jahren ein polyvalenter Lysatimpfstoff in der Erprobung, der die am häufigsten bei Infektionen des Respirationstraktes vorkommenden Keime enthält. Er wird lokal mittels Spray oder Inhalation gegeben und vorwiegend therapeutisch verwendet. Ausgehend von der Tatsache, daß nach lokaler Immunisierung mit inaktiviertem Antigen der Impfschutz sofort eintritt und keine Infektion provoziert wird (53,54), sollten bereits während einer chronischen Infektion die geschädigten Abwehrmechanismen zu neuer Aktivität veranlaßt werden. Da z.B. bei der chronischen Bronchitis eine Erschöpfung des lokalen IgA-Systems beobachtet wird, könnte durch den lokalen Antigenreiz eine Stimulierung desselben erfolgen (55,56). WERNER konnte bei 25 von 33 Patienten mit chronischer Bronchitis, die mit 12 Inhalationsimpfungen mit dem Lysatimpfstoff behandelt worden waren, sowohl eine Zunahme von IgA-bildenden Zellen in der Bronchialschleimhaut als auch eine kräftigere Markierung des IgA-Filmes

auf dem Epithel sowie eine Anreicherung von "secretory piece" und IgA innerhalb der Epithelzellen nachweisen (86). Die Berichte über die Therapie von chronischen Infektionen des gesamten HNO-Bereiches mit dem Lysatimpfstoff sind durchweg ermutigend (8,59,69). Die Stimulierung der lokalen Immunitätsmechanismen führte in vielen Fällen zur Normalisierung der Schleimhautverhältnisse und weitgehender Rezidivfreiheit. Daraus läßt sich auch eine prophylaktische Wirkung ablesen.

Da gerade in der Ära der Antibiotika im Respirationstrakt die Virusinfekte eine große Rolle spielen, stellt sich die Frage, ob durch eine Inhalationsimpfung mit bakteriellem Antigen durch die Stimulierung unspezifischer Abwehrmechanismen ein Schutz gegen Viren zu erzielen ist. In der vorliegenden Arbeit wurde dies am Beispiel einer Influenzavirus-Infektion der weißen Maus untersucht.

Material und Methoden

1) Versuchstiere: Es wurden ausschließlich NMRI-Mäuse (Naval Medical Research Institute) aus der Zucht des Robert Koch-Instituts verwendet. Das Gewicht der Tiere bei Versuchsbeginn betrug durchschnittlich 13 g, am Ende der Immunisierung 27 g. Die Tiere wurden zu je 25 in Plastikkkäfigen gehalten und erhielten Trockenfutter "Herilan" und Leitungswasser. Die Kontrolltiere lebten unter den gleichen Bedingungen.

2) Impfstoff: Für die Immunisierung wurde der kommerzielle Impfstoff IRS 19 der Fa. Sarbach (Lizenz und Vertrieb in Deutschland: Hefa-Frenon, Arzneimittel, 4712 Werne) verwendet. Er enthält nach Angaben des Herstellers die in 10%igem Glykokoll gelösten Bestandteile folgender Bakterien:

Diplococcus pneumoniae, Typ I	1,100 ml
Diplococcus pneumoniae, Typ II	1,100 ml
Diplococcus pneumoniae, Typ III	1,100 ml
Diplococcus pneumoniae, Typ V	1,100 ml
Diplococcus pneumoniae, Typ VIII	1,100 ml
Diplococcus pneumoniae, Typ XII	1,100 ml
Streptococcus pyogenes, Gruppe A	1,665 ml
Streptococcus pyogenes, Gruppe C	1,665 ml
Streptococcus faecalis, Gruppe D (S 19)	0,832 ml
Streptococcus faecalis, Gruppe D (S 105)	0,832 ml
Streptococcus pyogenes, Gruppe G	1,665 ml
Micrococcus pyogenes, var. aureus	6,66 ml

Gafyka tetragena	3,33 ml
Neisserie catarrhalis	2,22 ml
Neisseria flava	2,22 ml
neisseria perflava	2,22 ml
Haemophilus influenza	3,33 ml
Klebsiella pneumoniae	6,66 ml
Moraxella	3,33 ml
Na-Aethylmercurithiosalicylat	0,0025 g
Neroli-Essenz	0,0025 g
dem. Wasser	100 ml

Jedes ml Lysat entspricht dem Antigengehalt einer mikrobiellen Suspension von 15 Milliarden Erregern.

b) *S. typhi* murium-Impfstoff: Die für 24 Stunden bei 37°C auf Agarschalen bebrütete Kultur wurde mit phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (pH = 7,2) abgeschwemmt und 3 min bei 100°C inaktiviert. Die Keimzahl wurde auf 1×10^{10} Keime/ml eingestellt.

3) Immunisierung: Es wurden jeweils 50 Tiere in einem Blech- bzw. Kunststoffbehälter einem Sprühnebel des Impfstoffes, der durch ein "Pari-Aerosolgerät", wie es zur klinischen Therapie verwendet wird, erzeugt wurde, ausgesetzt. Die Teilchengröße betrug nach Angaben des Herstellers 0,5 μ - 5,5 μ . Das Gerät wurde so eingestellt, daß in 30 min 10 ml Impfstoff vernebelt wurden. Dies entsprach einer Kompressorleistung von 15 l/min. Die Immunisierung erfolgte an 2 x 5 bzw. 2 x 6 Tagen, wobei die Tiere jeweils zwischen 15 und

60 min im Inhalationskäfig verblieben. Eine Gruppe blieb vom Einschalten des Gerätes an gerechnet exakt 15 min, eine zweite exakt 30 min, eine dritte Gruppe blieb nach Abschalten des Gerätes nach 30 min noch 15 min in dem Behälter und konnte diesen "leeratmen" (diese Gruppe wird unter 45 min Expositionszeit geführt) und eine weitere Gruppe von Tieren blieb 60 min (45 min + 15 min nach Abschalten des Gerätes) dem Impfstoffnebel ausgesetzt. Die Impfung wurde von den Tieren gut vertragen.

4) Impfstoffdosis: Die vermutlich aufgenommene Antigenmenge wird nach einer vereinfachten Formel nach BOLOTOVSKII (4) berechnet:

$$x = f \cdot \frac{V}{L}$$

x = Gesamtgewicht der Tropfen in der Kammer

f = Durchschnittswert der erzeugten Konzentration des Sprays

(g/min) = 10 g in 30 min = 1/3 g/min.

V = Kammervolumen in Liter = 30 l.

L = Leistung des Kompressors = 15 l/min.

$$x = \frac{1g \cdot 30l \cdot min}{3min \cdot 15l} = \frac{2}{3} g = \frac{1}{45} g/l = \frac{1}{45000} g/ml$$

Atemvolumen der weißen Maus (38): 1,1 ml/min pro g Körpergewicht.

Durchschnittsgewicht der Tiere während der Immunisierung: 20 g.

Daraus folgt für die vermutlich aufgenommene Antigenmenge A:

$$A = \frac{1 \cdot 1,1 \cdot 20 \cdot Z}{45000} g = \frac{22 \cdot Z}{45000} g \quad (Z = \text{Expositionszeit in min})$$

1 g IRS 19 enthält die Antigene von $15 \cdot 10^9$ Keimen, 1 g S. typhi

murium-Impfstoff $10 \cdot 10^9$ Keime. Daraus folgt:

Vermutlich aufgenommene Dosis (A) von IRS 19-Keimen: $\frac{11}{1500}$ Z 10^9

Vermutlich aufgenommene Dosis (A) von S.t.m.-Keimen: $\frac{11}{2250}$ Z 10^9

IRS 19, 15 min 2x5 Tage (Z = 150 min): A = $1,1 \cdot 10^9$ Keime

IRS 19, 30 min 2x5 Tage (Z = 300 min): A = $2,2 \cdot 10^9$ Keime

IRS 19, 45 min 2x5 Tage (Z = 450 min): A = $3,3 \cdot 10^9$ Keime

IRS 19, 60 min 2x5 Tage (Z = 600 min): A = $4,4 \cdot 10^9$ Keime

IRS 19, 45 min, 2x6 Tage (Z = 540 min): A = $3,96 \cdot 10^9$ Keime

S. typhi murium, 45 min, 2x5 Tage (Z = 450 min): A = $2,2 \cdot 10^9$ Keime.

Diese Antigendosen liegen alle in dem für die Wirksamkeit einer oralen Immunisierung als optimal bestimmten Bereich (54) und dürften auch für eine Inhalationsimpfung eine ähnliche Wirkung haben, zumal auch MARWIK (38) mit ähnlichen Dosen einen guten Erfolg der Inhalationsimpfung zu verzeichnen hatte.

5) Virus: Zur Infektion wurde das mäusepathogene Influenzavirus A/ PR 8/ 34 verwendet, das nach 48 stündigem Wachstum auf bebrüteten Hühnereiern geerntet und auf einen Hämagglutinationstiter von 1 : 1280 eingestellt wurde.

Für die freundliche Überlassung des Influenzavirus danke ich Herrn Dr. Jürgen Werner von der Virusabteilung des Robert Koch-Institutes recht herzlich.

6) Infektion: Die Tiere wurden zwischen 7 und 18 Tagen nach der letzten Inhalation infiziert, indem sie mit Äther betäubt und zweimal bis zur Blasenbildung mit der Nase in die Viruslösung

eingetaucht wurden. Dies führte zu einer relativ konstanten Endmortalität der Kontrolltiere zwischen 60% und 80%.

Ergebnisse

Aus dem Tiermaterial von insgesamt 2210 Mäusen ist zu ersehen, daß eine unspezifische bakterielle Inhalationsimpfung bei Mäusen ab einer bestimmten Inhalationszeit (45 min/die) gegen eine 2 - 3 Wochen nach der letzten Immunisierung erfolgte Inhalationsinfektion mit Influenzavirus erfolgreich ist. Andererseits ist bei kürzerer Inhalationszeit (15 u. 30 min) und bei früherer Infektion (7. u. 10. Tag) eine erhöhte Mortalität der Immuntiere zu beobachten, während eine Erhöhung der Inhalationszeit von 45 auf 60 min und gleichzeitiger Änderung des Impfrhythmus von 2x5 auf 2x6 Tage keinen Schutzeffekt mehr hervorruft, bei Beibehaltung des Impfrhythmus von 2x5 Tagen eine Erhöhung der Inhalationszeit auf 60 min/die durchaus noch erfolgreich ist, vor allem dann, wenn in diesem Falle die Infektion noch später (18. Tag) erfolgt.

Die Ergebnisse im Einzelnen: Aus Versuch I geht hervor, daß bei 30minütiger Inhalationszeit und Infektion am 10. Tag mehr geimpfte Tiere starben als Kontrolltiere. Wegen der Vermutung, daß die Impfung den Tieren geschadet haben könnte, wurde zunächst in Versuch IIa die Inhalationszeit verlängert auf 45 min und der Zeitpunkt der Infektion auf den 7. Tag vorverlegt. Es zeigt sich eine noch höhere Mortalität der Immuntiere als in Versuch I, was entweder auf die höhere Antigendosis oder auf die frühere Infektion zurückzuführen wäre. Versuch IIb jedoch zeigt, daß durch die höhere Antigendosis dann eine Schutzwirkung her-

oder 14. Tag nach der letzten Inhalation gesetzten Infektion mit Influenzavirus einen signifikanten Impfschutz erzeugt. Zum andern sind auch die Ergebnisse der Versuche IIb, V, VI, Xa, VIII, Xb statistisch gesichert, d.h. der Impferfolg bei 45 - 60minütiger Inhalationsimmunisierung gegen eine Infektion am 13., 14. und 18. Tag ist signifikant. Für eine statistische Sicherung des Impferfolges am 18. Tag reichte das Zahlenmaterial nicht aus, jedoch ist auffällig, daß sich in 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit insgesamt 470 Tieren jedesmal ein Impfschutz eingestellt hat. Auch die Tatsache, daß bei Inhalation am 7. und am 10. Tag eine erhöhte Mortalität der Immuntiere eintritt läßt sich mit einem Echtheitsgrad von 1,2 statistisch sichern.

Inhal. 45 - 60 min (2X5 Tage), Infekt. am 13/14. Tag

	Immuntiere			Kontrollen					
Vers. Nr.	Zahl	$\overline{\text{II}}$	%	Zahl	$\overline{\text{II}}$	%	Db	Dz	E
IIb,V,VI	150	83	55,3	120	91	75,8	20,5	16	1,28

Db = beobachtete Differenz, Dz = höchstzulässige Zufallsdifferenz, $E = \frac{Db}{Dz}$ = Echtheit der Differenz

Inhal. 45-60 min (2X5 Tage), Inf. am 13/14/18. Tag

	Immuntiere			Kontrollen					
Vers. Nr.	Zahl	$\overline{\text{II}}$	%	Zahl	$\overline{\text{II}}$	%	Db	Dz	E
IIb,V,VI,Xa, V,VIII,Xb	600	380	63,3	340	251	73,8	9,51	7,95	1,19

Inhal. 30 - 45 min (2X5 Tage), Infekt. am 7/10. Tag

	Immuntiere			Kontrollen					
Vers. Nr.	Zahl	$\overline{\text{II}}$	%	Zahl	$\overline{\text{II}}$	%	Db	Dz	E
I,IIa,V	150	116	77,3	120	71	59,2	18,1	15	1,2

vorggerufen werden kann, wenn der Zeitabstand der Infektion 13 Tage von der letzten Immunisierung an beträgt, während in Versuch III bei einer Inhalationszeit von 15 min und ebenfalls Infektion am 13. Tag wiederum mehr Immuntiere starben. Um nun festzustellen, ob der Lysatimpfstoff die Maus schädigt oder ob die Rauminhalation eine "Erkältung" der Tiere mit verminderter Resistenz hervorruft (der dichte Sprühnebel benäßt ja das Fell der Tiere und der Vernebler erzeugt obendrein noch Zugluft), verglich ich in Versuch IV, der parallel zu Versuch IIb und III lief, einmal die Inhalationsimmunisierung mit dem Lysatimpfstoff von 15 und 30 min mit der Gabe des Impfstoffes mittels Nasentropfen (2 Mal/die in jedes Nasenloch je einen Tropfen), zum anderen wurden 2 Gruppen der Tiere einem Sprühnebel von NaCl 15 und 30 min lang ausgesetzt. Die Infektion erfolgte am 7. Tag. Die Ergebnisse dieses Versuches überraschen, da zum einen die erhöhte Mortalität der Immuntiere wie in Versuch I nicht auftrat, zum anderen die 30minütige Inhalation von NaCl die beste Schutzwirkung zeigt gefolgt von der Gabe des Impfstoffes mittels Nasentropfen. Diese Ergebnisse bewegen sich, wie auch die vorigen, im Bereich statistischer Zufallsschwankungen. Im weiteren Verlauf nun ließ ich die Tiere 45 min lang den Lysatimpfstoff inhalieren und infizierte in Versuch V vergleichend am 10., 14. und 18. Tag, wobei sich am 10. Tag wiederum wie in Versuch I die erhöhte Mortalität der Immuntiere zeigte, während bei Infektion am 14. und 18. Tag die geimpften Tiere teilweise geschützt waren. Auch in Versuch VI und VIII konnte diese Schutzwirkung am 14. und 18. Tag reprodu-

ziert werden. Im Versuch VII sollte nun noch der unspezifische Schutzeffekt des Lysatimpfstoffes mit dem von S, typhi murium Impfstoff verglichen werden, wobei wiederum 45 min Inhalationszeit angesetzt waren und die Infektion am 14. Tag erfolgte, da in den bisherigen Versuchen mit diesem Vorgehen der beste Erfolg zu erzielen war. Bei diesem Versuch wurden die Tiere jedoch infolge eines Versehens einer zu hohen Infektionsdosis ausgesetzt, sodaß die Tiere aller 3 Gruppen durch die massive Infektion in ähnlich hoher Zahl und auch fast gleich schnell starben.

Da die Inhalation des Impfstoffes von 45 min über 2x5 Tage einen unspezifischen Schutz vom 13. Tag an erzeugte, der Wirkungsindex dieser Immunisierung mit Ausnahme von Versuch IIb sehr gering war, erhöhte ich in Versuch IX und X die Inhalationszeit und damit die aufgenommene Antigendosis. Dabei zeigte sich, daß die Erhöhung der täglichen Inhalationszeit von 45 auf 60 min eine bessere unspezifische Abwehr am 18. als am 14. Tag erzeugt (Versuch X a/b), während die Erhöhung der Inhalationszeit auf 60 min und Abweichung vom bisherigen Impfrhythmus von 2x5 auf 2x6 Tage keine Schutzwirkung mehr erbringt.

Statistische Sicherung

Nach der Methode von KOLLER (30) läßt sich einmal mit einem Echtheitsgrad von $E=1,28$ statistisch sichern, daß eine Inhalation des Lysatimpfstoffes von 45 - 60 min gegen eine am 13.

Vers. I : 30min Inh. Zeit
(IRS 19) Inf. am 10.Tag

Tag n. Inf.	Immuntiere		Kontrollen	
	Zahl d. Gest.	Ges. Mort.	Zahl d. Gest.	Ges. Mort.
2	-	-	-	-
3	2	4%	1	2%
4	21	46%	10	22%
5	6	58%	7	36%
6	5	68%	6	48%
7	1	70%	3	54%
8	-	-	1	56%
9	1	72%	1	58%
10	-	-	1	60%
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-

Vers. IIa: 45min Inh. Zeit
(IRS 19) Inf. am 7.Tag

Tag n. Inf.	Immuntiere		Kontrollen	
	Zahl d. Gest.	Ges. Mort.	Zahl d. Gest.	Ges. Mort.
2	1	2%	-	-
3	11	24%	1	2%
4	11	46%	6	14%
5	8	62%	4	22%
6	1	64%	3	28%
7	1	66%	7	42%
8	2	70%	3	48%
9	2	74%	2	52%
10	1	76%	1	54%
11	2	80%	1	56%
12	-	-	-	-

Vers. IIb: 45min Inh. Zeit
(IRS 19) Inf. am 13.Tag

Tag n. Inf.	Immuntiere		Kontrollen	
	Zahl d. Gest.	Ges. Mort.	Zahl d. Gest.	Ges. Mort.
2	-	-	-	-
3	1	2%	-	-
4	6	14%	13	26%
5	7	28%	16	58%
6	4	36%	6	70%
7	3	42%	3	76%
8	1	44%	2	80%
9	2	48%	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-

Vers. III: 15 min Inh. Zeit
(IRS 19) Inf. am 13. Tag

Tag n. Inf.	Immuntiere			Kontrollen		
	Zahl d. Gest.	Ges. Mort.		Zahl d. Gest.	Ges. Mort.	
2	-	-	-	-	-	-
3	8	16%	-	8	16%	-
4	23	62%	-	8	32%	-
5	6	74%	-	10	52%	-
6	1	76%	-	8	68%	-
7	2	80%	-	1	-	-
8	3	86%	-	1	70%	-
9	1	88%	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-

Vers. IV: 15 u. 30 min IRS 19, 15 u. 30 min NaCl, 2 Mal täglich je
1 Tropfen IRS 19 in jedes Nasenloch. Infektion am 7. Tag.

Tag n. Inf.	30 min IRS 19			15 min IRS 19			30 min NaCl			15 min NaCl			2X/die lTr. in j. Nas. l.			Kontrollen	
	Zahl d. Gest.	Ges. Mort.		Zahl d. Gest.	Ges. Mort.		Zahl d. Gest.	Ges. Mort.		Zahl d. Gest.	Ges. Mort.		Zahl d. Gest.	Ges. Mort.		Zahl d. Gest.	Ges. Mort.
2	-	-	-	-	-	-	1	2%	-	-	1	2%	-	-	-	-	-
3	4	8%	-	2	4%	-	3	8%	-	-	3	8%	-	1	2%	1	2%
4	9	26%	-	9	22%	-	8	24%	-	22%	8	24%	-	8	18%	15	31%
5	11	48%	-	15	52%	-	15	54%	-	40%	15	54%	-	11	40%	9	50%
6	8	64%	-	3	58%	-	2	58%	-	44%	2	58%	-	5	50%	2	54%
7	3	70%	-	-	-	-	2	62%	-	50%	2	62%	-	3	56%	7	68%
8	1	72%	-	2	62%	-	2	66%	-	54%	2	66%	-	1	58%	-	-
9	-	-	-	2	66%	-	1	72%	-	56%	3	72%	-	2	62%	3	74%
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60%	-	-	-	1	64%	-	-
11	-	-	-	-	-	-	1	74%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	76%

Vers. V: 45 min Inhalationszeit (IRS 19)
Infektion am 10., 14., 18. Tag

Tag n. Inf.	Immuntiere 10. Tag			Kontrollen 10. Tag			Immuntiere 14. Tag			Kontrollen 14. Tag			Immuntiere 18. Tag			Kontrollen 18. Tag		
	Zahl d. Gest.	Ges. Mort.		Zahl d. Gest.	Ges. Mort.		Zahl d. Gest.	Ges. Mort.		Zahl d. Gest.	Ges. Mort.		Zahl d. Gest.	Ges. Mort.		Zahl d. Gest.	Ges. Mort.	
2	-	-		-	-		-	-		-	-		-	-		-	-	
3	3	6%		-	-		-	-		-	-		-	-		-	-	
4	18	42%		4	29%		4	8%		3	15%		5	10%		1	5%	
5	11	64%		3	35%		16	40%		4	35%		8	26%		7	40%	
6	5	74%		2	45%		7	54%		6	65%		8	42%		3	55%	
7	2	78%		2	55%		2	58%		1	70%		8	58%		1	60%	
8	-	-		1	60%		2	62%		-	-		4	66%		2	70%	
9	-	-		1	65%		1	64%		1	75%		-	-		1	75%	
10	1	80%		-	-		-	-		-	-		-	-		-	-	
11	-	-		-	-		-	-		-	-		-	-		-	-	
12	-	-		-	-		-	-		-	-		-	-		-	-	

Vers. VI: 45min Inh. Zeit
(IRS 19) Inf. am 14. Tag

Tag n. Inf.	Immuntiere			Kontrollen		
	Zahl d. Gest.	Ges. Mort.		Zahl d. Gest.	Ges. Mort.	
2	-	-		-	-	
3	-	-		-	-	
4	3	6%		4	8%	
5	10	26%		9	26%	
6	8	42%		16	58%	
7	4	50%		3	64%	
8	2	51%		1	66%	
9	-	-		2	70%	
10	-	-		1	72%	
11	-	-		-	-	
12	-	-		-	-	

Vers. VII: 45min Inh.Zeit(IRS 19,S.t.m.)
Inf. am 14. Tag

Tag n. Inf.	IRS 19		S.t.m.		Kontrollen	
	Zahl d. Gest.	Ges. Mort.	Zahl d. Gest.	Ges. Mort.	Zahl d. Gest.	Ges. Mort.
2	-	-	-	-	-	-
3	14	14%	5	5%	9	9%
4	38	52%	43	48%	41	50%
5	22	74%	16	64%	22	72%
6	7	81%	1	65%	4	76%
7	3	84%	7	72%	3	79%
8	3	87%	4	76%	3	82%
9	-	-	1	77%	1	83%
10	1	88%	2	79%	1	84%
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-

Vers.VIII:45min Inh.Zeit
(IRS 19) Inf. am 18.Tag

Tag n. Inf.	Immuntiere		Kontrollen	
	Zahl d. Gest.	Ges. Mort.	Zahl d. Gest.	Ges. Mort.
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	14	14%	22	23%
5	22	36%	19	42%
6	13	49%	11	53%
7	8	57%	6	59%
8	3	60%	2	61%
9	1	61%	3	64%
10	-	-	2	66%
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-

Vers.IX:60min Inh.Zeit(2X6Tg)
(IRS 19) Inf. am14.Tag

Tag n. Inf.	Immuntiere		Kontrollen	
	Zahl d. Gest.	Ges. Mort.	Zahl d. Gest.	Ges. Mort.
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	31	20,7%	18	12,0%
5	35	44,0%	29	31,3%
6	13	52,7%	16	42,0%
7	2	54,0%	10	48,7%
8	2	56,5%	7	53,3%
9	2	56,7%	3	55,5%
10	-	-	-	-
11	-	-	1	56,0%
12	-	-	-	-

Vers.Xa:60min Inh.Zeit
(IRS 19)Inf. am 14.Tag

Tag n. Inf.	Immuntiere		Kontrollen	
	Zahl d. Gest.	Ges. Mort.	Zahl d. Gest	Ges. Mort
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	43	28,7%	16	32%
5	30	48,7%	12	56%
6	21	62,7%	6	68%
7	9	68,7%	-	68%
8	4	71,3%	3	74%
9	1	72,0%	1	76%
10	-	-	1	78%
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-

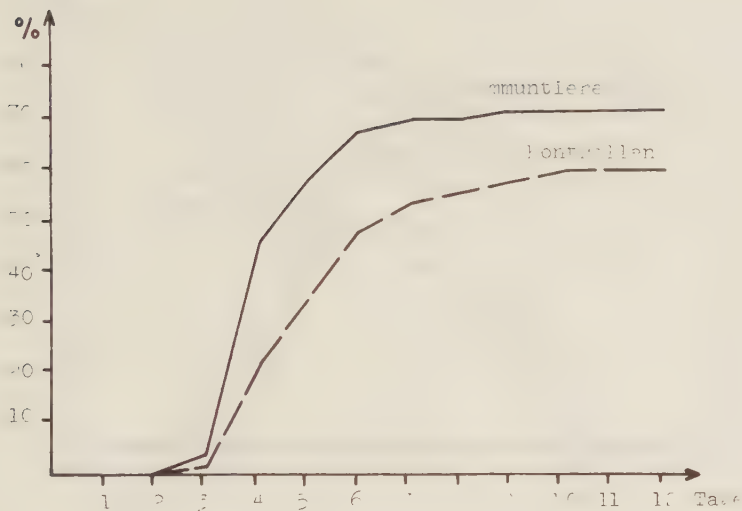
Vers.Xb:60min Inh.Zeit
(IRS 19)Inf. am 18.Tag

Tag n. Inf.	Immuntiere		Kontrollen	
	Zahl d. Gest.	Ges. Mort.	Zahl d. Gest.	Ges. Mort
2	-	-	-	-
3	1	0,7%	-	-
4	49	33,3%	18	36%
5	33	55,3%	16	68%
6	6	59,3%	2	72%
7	5	62,7%	3	78%
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	1	63,3%	1	80%
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-

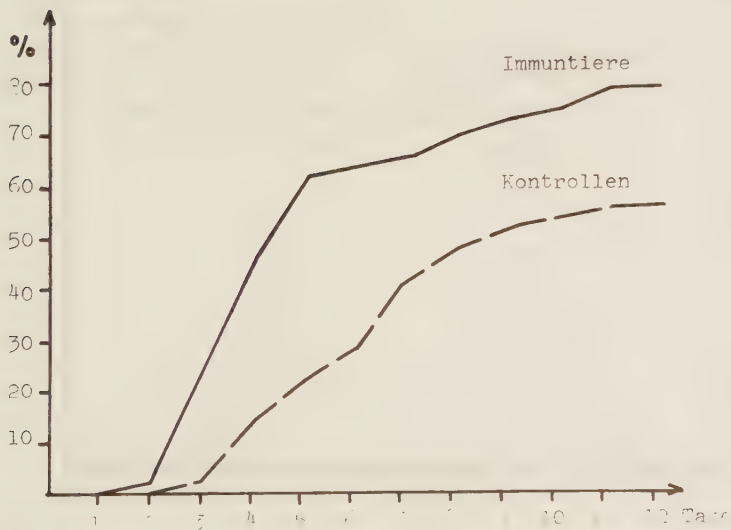
Zusammenfassung der 10 Einzelversuche

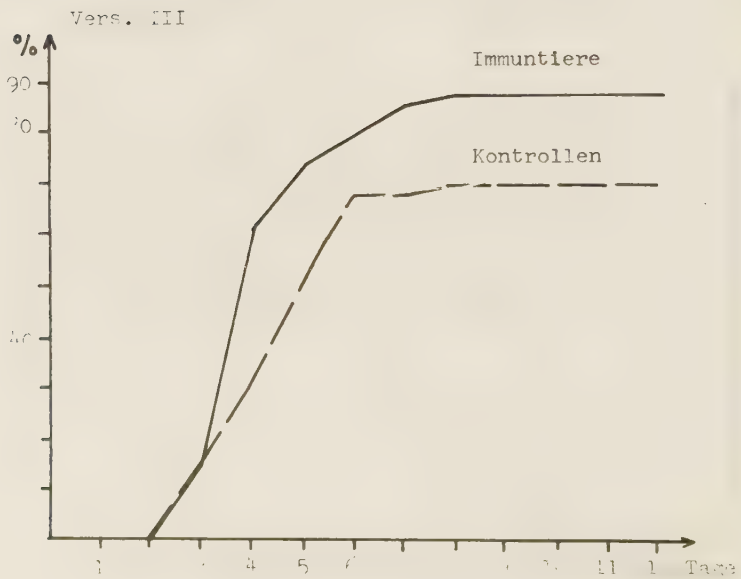
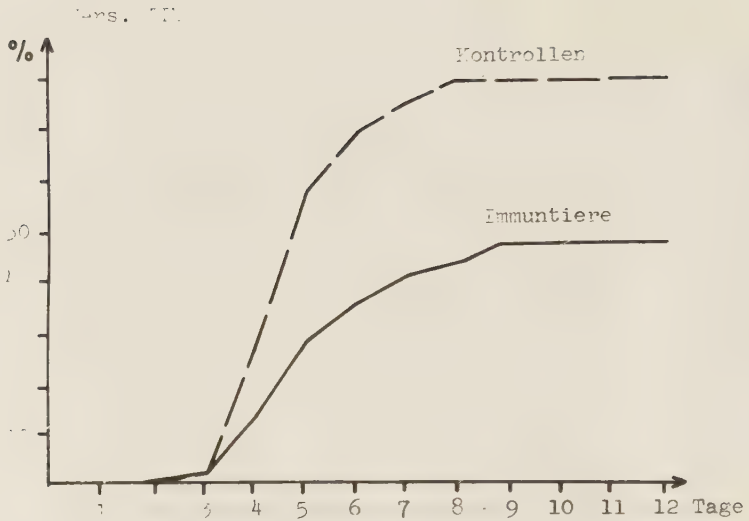
Vers. Nr.	Inf. Tag	Inhalations- zeit	Immuntiere			Kontrollen			W.I. $\frac{(b-a)}{b} \cdot 100$
			Zahl	davon gest.	% a	Zahl	davon gest.	% b	
Iia	7.	45 min	50	40	80%	50	28	56%	5,26
IV	7.	30 min	50	36	72%	50	38	76%	7,89
"	7.	15 min	50	35	70%	"	"	"	
"	7.	30 min	50	30	60%	"	"	"	
"	7.	15 min $\frac{\text{NaCl}}{\text{NaCl}}$	50	37	74%	"	"	"	
"	7.	2X je 1Trpf	50	32	64%	"	"	"	15,79
I	10.	30 min	50	36	72%	50	30	60%	
V	10.	45 min	50	40	80%	20	13	65%	
III	13.	15 min	50	44	88%	50	35	70%	
Iib	13.	45 min	50	24	48%	50	40	80%	40
V	14.	45 min	50	32	64%	20	15	75%	14,67
VI	14.	45 min	50	27	54%	50	36	72%	25
VII	14.	45 min	100	88	88%	100	84	84%	
"	14.	45 min S.t.m	100	79	79%	"	"	"	5,95
IX	14.	60 min 2X6Tg	150	85	56,7%	150	84	56%	7,61
Xa	14.	60 min	150	108	72%	50	39	78%	12
V	18.	45 min	50	33	66%	20	15	75%	
VIII	18.	45 min	100	61	61%	100	66	66%	7,57
Xb	18.	60 min	150	95	63,3%	50	40	80%	20,87

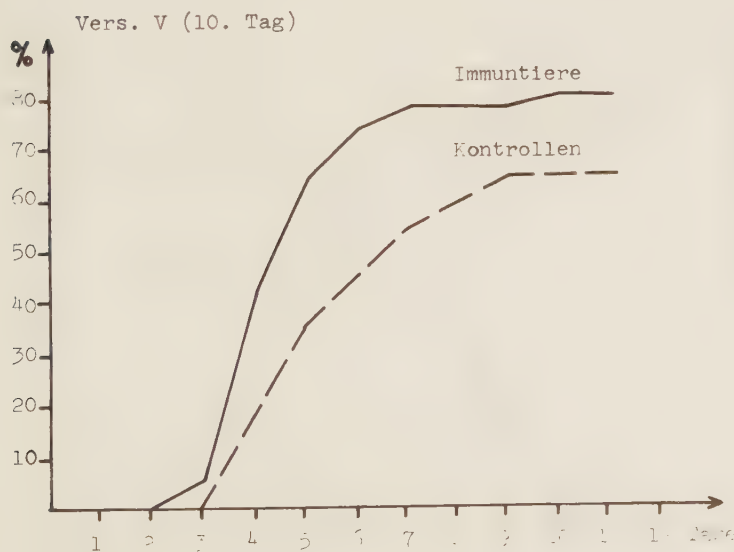
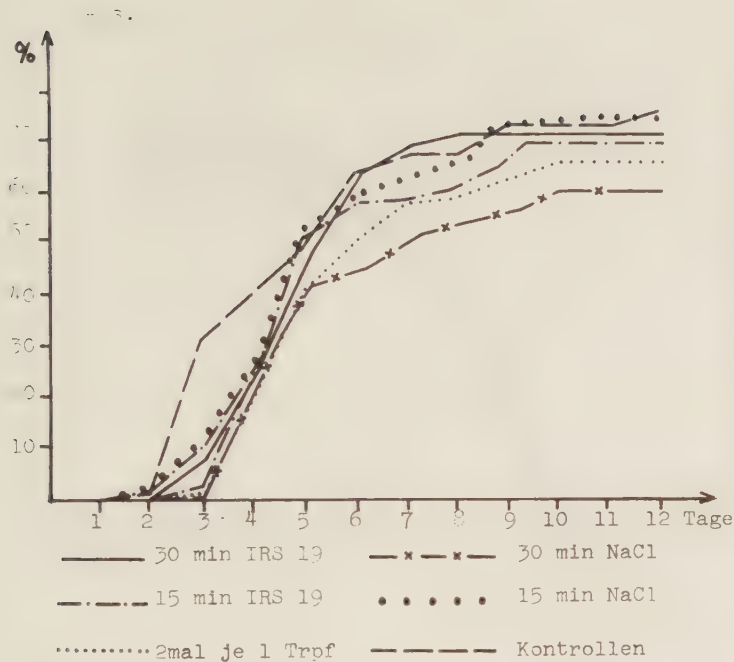
Vers. I



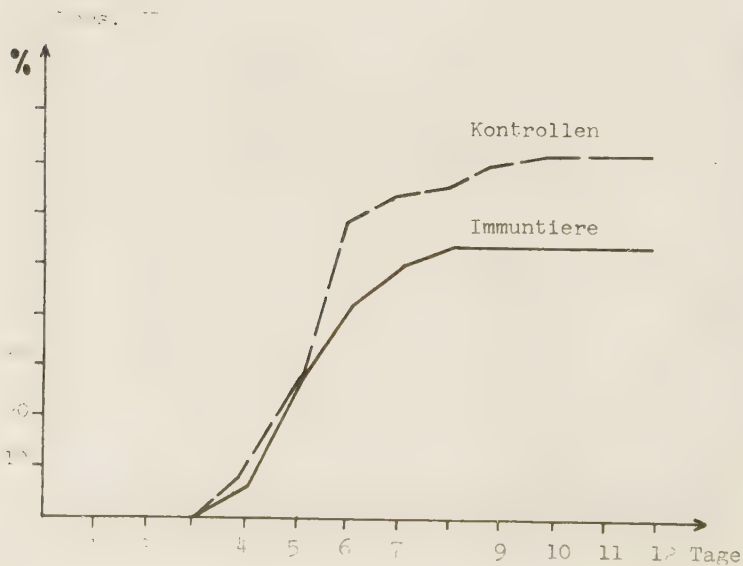
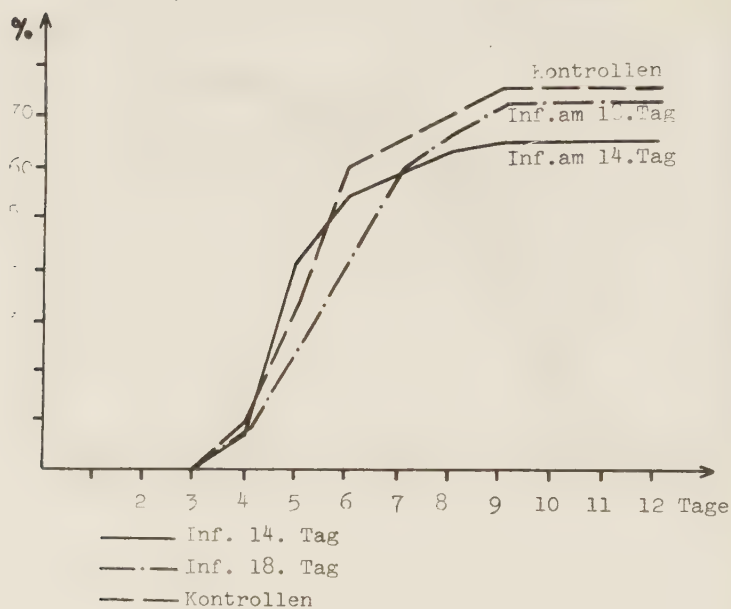
Vers. IIa



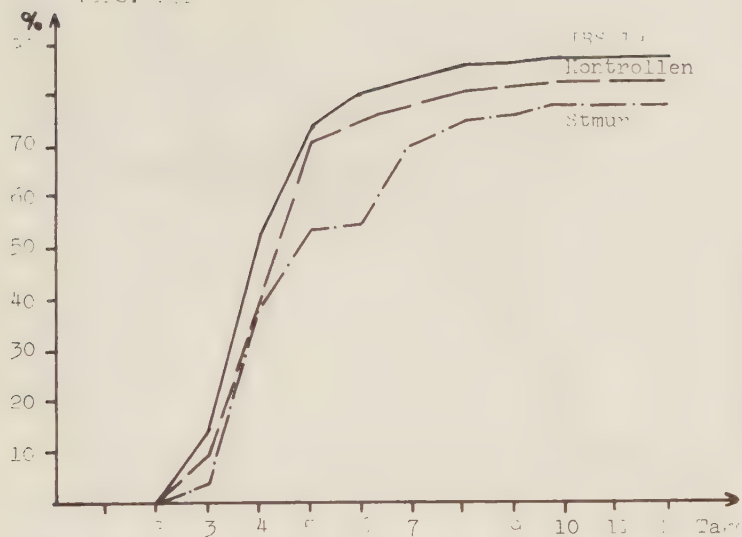




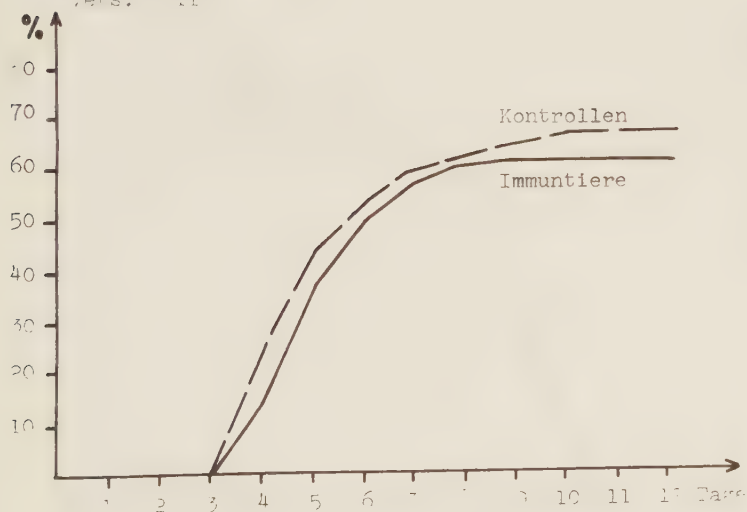
Vers. V (14.u.18.Tag, Kontrollen gemittelt)



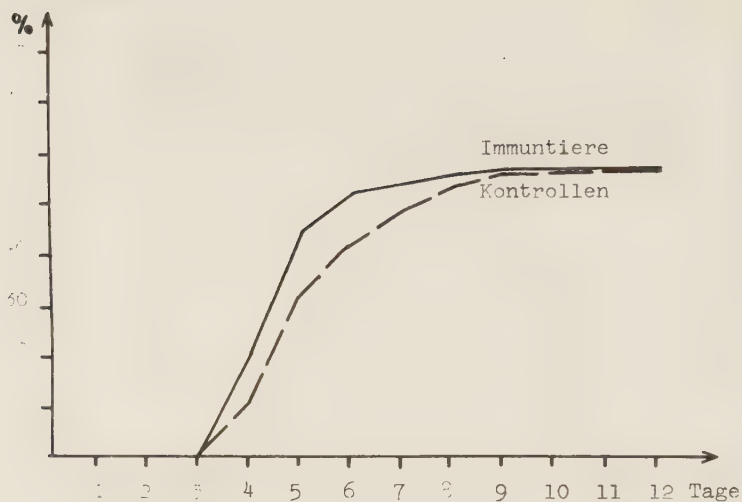
Vers. III



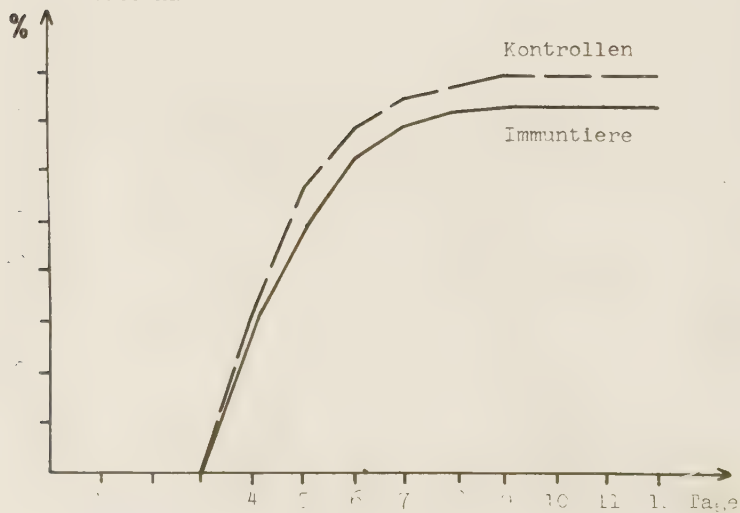
Vers. IIII

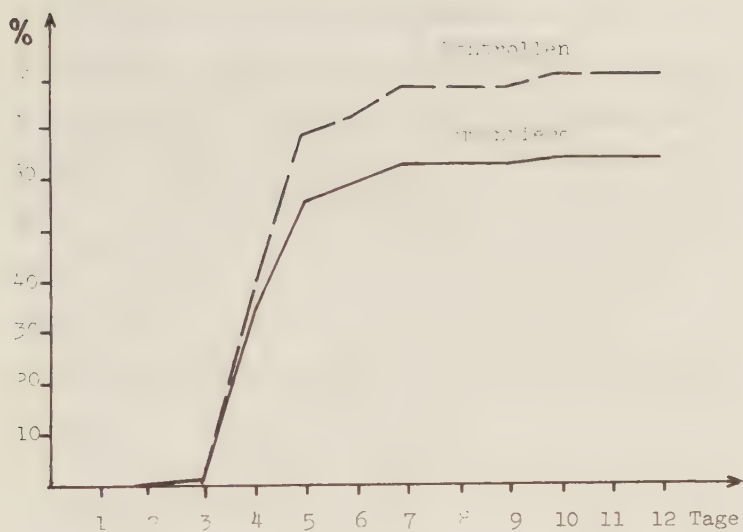


Vers. Xa



Vers. Xa





Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, daß durch lokale Anwendung eines bakteriellen Antigens eine Stimulierung unspezifischer Abwehrmechanismen erfolgt, die einen statistisch signifikanten Schutz gegen eine Influenzavirusinfektion erzeugen. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse der lokalen Immunisierung (48,49) war dies auch zu erwarten. Dieser unspezifische Schutz kann hervorgerufen sein durch die lokale IgA-Bildung (73), durch die Steigerung der Phagozytoserate (1,29,65,67) und Opsonisierung (41) oder durch Lysozyme (22,23). Erfahrungsgemäß tritt nach der lokalen Anwendung von inaktiviertem Antigen der Impfschutz sehr früh ein und zwar schon am ersten Tag nach der Immunisierung (44,51). Umso erstaunlicher sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, da am 7. und 10. Tag (und wahrscheinlich auch an den anderen Tagen bis zum 13. Tag) eine Schädigung der Maus durch den Impfstoff erfolgt, die erst etwa 2 Wochen nach der letzten Antigenaufnahme überwunden ist, sodaß sich erst zu diesem Zeitpunkt Schutzmechanismen ausbilden können. Man könnte annehmen, daß irgendein Bestandteil des Impfstoffes (z.B. Neroli-Essenz) von der Maus nicht vertragen wird, sodaß zunächst der lokale Immunapparat geschädigt wird und eine erhöhte Infektionsanfälligkeit auftritt. Der lokale Immunapparat braucht dann eine gewisse Zeit, um sich zu erholen und den Antigenreiz mit der Ausbildung von Abwehrmaßnahmen zu beantworten. Die Schädigung durch den Impfstoff oder eines seiner Bestandteile scheint eher dann einzutreten, wenn

die aufgenommene Impfstoffmenge gering ist, wie aus Versuch III zu ersehen ist, während bei höherer Antigendosis sich die positiven und negativen Wirkungen aufzuheben scheinen, wie aus Versuch IX hervorgeht. Es könnte sein, daß das schädigende Agens eine nur kurze Einwirkungszeit benötigt, während die bakteriellen Antigene in dieser Zeit zu wenig Gelegenheit hatten, Abwehrmechanismen zu stimulieren. Eine genaue Klärung dieses Sachverhaltes kann jedoch nur durch weitere Immunisierungsversuche mit dem Lysatimpfstoff ohne Zusätze und durch Ermittlung der optimalen Impfstoffdosis und durch eine exakte Zeitkinetik erfolgen. Außerdem wäre es wichtig zu wissen, ob die erhöhte Mortalität der Immuntiere auch bei spezifischer Infektion eintritt, was durch entsprechende Infektionsversuche mit Neisserien, Streptokokken, Pneumokokken und anderen in dem Lysatimpfstoff enthaltene Bakterien geklärt werden müßte. Aus der Literatur ist eine allerdings nur einige Stunden anhaltende "negative Phase der Resistenz" nach intraperitonealer Gabe von abgetöteten Bakterien bekannt, während der mehr Immuntiere als Kontrollen starben (13), wobei man erwähnen muß, daß eine intraperitoneale Impfung mit inaktiviertem Antigen einer lokalen Immunisierung entsprechen kann (32). Es ist jedoch kaum vorstellbar, daß diese negative Phase so lange wie in den vorliegenden Versuchen dauert.

Eine Erklärung für das verspätete Auftreten des Impfschutzes, nicht jedoch für die negative Phase wäre die von WALDMAN, MANN und Mitarbeitern gefundene Tatsache, daß der IgA-Spiegel in den Sekreten seinen Gipfel erst 2 - 3 Wochen nach der Impfung

erreicht (37,76). DOLMELZEL ermittelte ein lokales IgA-Maximum am 35. Tag nach Beginn der Immunisierung (11). Für die vorliegende Arbeit hieße das, daß die unspezifische Abwehr von den lokalen IgA-Antikörpern abhängig ist. Dies könnte einmal durch die unspezifische Wirkung der sekretorischen IgA allein bedingt sein (78) oder durch deren Opsoninwirkung. In diesem Zusammenhang erscheinen Arbeiten interessant, in denen die Leukozyten erst in Gegenwart von Antikörpern eine viruzide Wirkung entfalten können (21), was jedoch von anderen Autoren bestritten wird.

Wie bereits erwähnt, sind Viren in der Lage, sich in den Makrophagen zu vermehren, jedoch ist diese Fähigkeit in den Makrophagen immunisierter Tiere stark reduziert (21). Es wäre deshalb wichtig zu wissen, wie sich das Influenzavirus in den Makrophagen des Respirationstraktes verhält und ab wann und mit Hilfe welcher Zusatzfaktoren die virale Vermehrungsfähigkeit unterdrückt wird.

Zusammenfassung

1) Eine unspezifische Inhalationsimpfung mit einem polyvalenten bakteriellen Lysatimpfstoff führt bei der Maus zu einem signifikanten Schutz gegenüber einer Influenzavirus-Inhalationsinfektion.

2) Der Impferfolg ist entscheidend davon abhängig, daß bei der

Inhalation eine bestimmte Zeit (45 - 60 min an 2x5 Tagen) eingehalten wird und insbesondere 45 min/die nicht unterschritten werden und andererseits die Infektion nicht zu früh erfolgt (vor 2 Wochen nach der letzten Immunisierung).

3) Wenn die Infektion zu früh (am 7. und am 10. Tag) erfolgt, so tritt eine signifikant höhere Mortalität der geimpften Tiere auf. Die möglichen Ursachen hierfür werden diskutiert.

Literaturverzeichnis

- 1) ALLEN, E.G., S. MUDD: Protection of mice against vaccinia virus by bacterial infection and sustained stimulation with specific bacterial antigens. *Infect. Immun.* 7, 62 (1973)
- 2) BESIREDKA, A.: Die lokale Immunisierung. Barth Verlag Leipzig 1926.
- 3) BLUMENAU, N.R.: Über die aktive Immunisierung von Kindern gegen Diphtherie nach dem Prinzip von S.K. Dserzgowsky. *Russky Wratsch* 1911, 151 zit. b. *RAETTIG* (43).
- 4) BOLOTOVSKII, V.M. Theory of work of the IBK-I aerosol chamber for the study of experimental respiratory infections. I. Dynamics of the work of the aerosol chamber. II. Evaluation of aerosol from certain physical parameters. *Problems of Virology* 6, 492 u. 497 (1961).
- 5) BUCKLAND, F. et al.: *Nature London* 166, 354 (1952) zit. b. *BOLOTOVSKII* (4).
- 6) BUSCH, B.: *Praktikum des Infektions- und Impfschutzes*. Verlag Hildegard Hoffmann, Berlin 1974.
- 7) BURROWS, W., W.E. ELLIOT, J. HAVENS: Studies on immunity to Asiatic cholera. IV: The excretion of coproantibody in experimental enteric cholera in the guinea pig. *J. Infect. Dis.* 81, 261 (1947)
- 8) CACRAZ, M., D. YAVORDIOS: Behandlung durch polyvalenten Impf-

stoff über die Schleimhaut und lokale Immunität. Therapie-Woche 23, 3319 (1973).

9) DAVIES, A.: An investigation into the serological properties of dysentery stools. Lancet 2, 1009 (1922).

10) DEGRÉ, M., M. DAHL: Production of an interferon-like agent following inoculation with bacterial vaccine. Proc. Soc. Exp. Biol. 137, 233 (1971).

11) DOLEZEL, J., J. BIENENSTOCK: γ A and non- γ A immune response after oral and parenteral immunization of the hamsters. Cell. Immun. 2, 458 (1971).

12) DSERZGOWSKY, S.K.: Über die aktive Immunisierung des Menschen gegen Diphtherie. Russky Wratsch 1910, 753, zit. b. RAETTIG (43).

13) DUBOS, R.J., R.W. SCHAEGLER: Reversible changes in the susceptibility of mice to bacterial infections. 1. Changes brought about by injection of pertussis vaccine or of bacterial endotoxins. J. Exp. Med. 104, 53 (1956).

14) EGUCHI, CH.: Versuche über Infektion und Immunisierung junger und alter Mäuse und Meerschweinchen mit Pneumokokken und Streptokokken durch Fütterung und Inhalation. Zschr. f. Hyg. 105, 74 (1925).

15) EBERLICH, P.: Experimentelle Untersuchungen über Immunität.

Dtsch. Med. Wschr. 1891, 976 u. 1218.

16) FAZERAS de St. GROTH, S., M. DONELLEY: Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 28, 61 (1950), zit. b. MANN (37).

17) FERNALD, G.W., W.A. CLYDE, J. BIENENSTOCK: Immunglobulin-containing cells in lungs of hamsters infected with Mycoplasma pneumoniae. J. Immunol. 108, 1400 (1972).

18) FRETER, R.: Coproantibody and bacterial antagonism as protective factors in experimental enteric cholera. J. Exp. Med. 104, 419 (1956).

19) FRETER, R., E.J. GANGAROSA: Oral immunization and production of coproantibody in human volunteers. J. Immunol. 91, 724 (1963).

20) FUKUI, Y., K. FUKUI, T. MORIYAMA: Inhibition of enzymes by human salivary immunglobulin A. Infec. Immun. 8, 335 (1973).

21) GRESSER, I., D.J. LANG: Relationships between viruses and leucocytes. Progr. Med. Virol. 8, 62 (1969).

22) GROSSGEBALER, K., H. LANGMAAK: Lysozyme. Ergebnisse und Probleme. Klin. Wschr. 46, 1121 (1968).

23) GROSSGEBAUER, K., H. RAETTIG, H. LANGMAAK, R. KÜCHLER: Zur unspezifischen Schutzwirkung von Lysozym und Aristolochiasäure bei bakteriellen und viralen Infektionen. Zbl. Bakt. Hyg. I. Orig. 213, 401 (1970).

- 24) HERBST, G.: Das Lymphgefäßsystem und seine Verrichtungen. Göttingen 1844, S. 333
- 25) HEREMANS, J.F., J.P. VAERMANN: Biological significance of IgA-antibodies in serum and secretions. Progr. Immunol. New York: Acad. Press. 875 (1971).
- 26) HIRSCH, R.: Über das Vorkommen von Stärkekörnern im Blut und im Urin. Zschr. Exp. Path. 3, 390 (1906).
- 27) HOFFMANN, M.: Tierversuche zur Schleimhautpassage und Resorptionsvirämie von T₃-Phagen nach oraler, trachealer und rektaler Gabe. Zbl. Bakt. Hyg. 1. Orig. 198, 371 (1965).
- 28) JAWETZ, E., J.L. MELNICK, E.A. ADELBURG: Medizinische Mikrobiologie. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1973, 600.
- 29) KLUGER, E.: Inaug. Diss. FU Berlin. In Vorbereitung.
- 30) KOLLER, S.: Neue graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen. Dr. Dietrich Steinkopff Verlag Darmstadt 1969.
- 31) LEFÈVRE, H., W. UECKER, P. BLUMEL, H. RAETIG: Untersuchungen zur oralen Immunisierung. Die sekundäre Immunreaktion nach primärer oraler und nachfolgender oraler bzw. parenteraler Applikation von bovinem Serumalbumin (BSA) beim Kaninchen. Zbl. Bakt. Hyg. 1. Orig. 213, 548 (1970).
- 32) LEFÈVRE, H., H. PICHL, H.J. WERNER, A. WIENER, A. LISSY:

Vergleichende Untersuchung der Intestinalantikörper nach oraler oder intraperitonealer Immunisierung von Mäusen mit Mammelerythrozyten- Zbl. Bakt. Hyg. 1. Abt. Orig. A 217, 529 (1971).

33) LIEBERMANN, P., B.S. BERLIN, J. METZGER, R. PATTERSON:

Production of antibody in the canine tracheal pouch after local and systemic influenza immunization. J. Immunol. 109, 864 (1972).

34) LIETZ, B., H. RAETTIG: Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen: 5. Mitteilung: Tierversuche zur Schutzimpfung gegen Dyspepsiecoli-Infektionen. Zbl. Bakt. Hyg. 1. Orig. 204, 543 (1967).

35) LOEFFLER, F.: Über Immunisierung per os. v. Leuthold-Gedenkschrift I, 247 (1906).

36) LOO VAN DE, J.: Über die Lokalisation der Antikörperbildung nach aerogener Immunisierung. Virch. Arch. path. Anat. 333, 40 (1960).

37) MAEN, J.J., R.H. WALDMAN, Y. TOGO, G.G. REINER, A.T. DAWKINS, J.A. KASEL: Antibody response in respiratory secretions of volunteers given live and dead influenza virus. J. Immunol. 100, 726 (1968).

38) MAJWIL, G.: Tierversuche zur Inhalationsimpfung mit inaktivierten *S. typhi* murium-Bakterien. Inaug. Diss. FU Berlin 1966.

39) NEUMANN-SCÖNWETTER, B.: Die lokale Immunisierung mit inakti-

vierten Poliomyelitisvirus. Inaug. Diss. FU Berlin 1968.

40) N.N.: Die Influenzavirus-Schutzimpfung. Der Arzneimittell-
brief 8, 75 (1974).

41) OPFERKUCH, W.: Humorale Mechanismen der körpereigenen Ab-
wehr. Zbl. Bakt. Hyg. 1. Abt. Orig. A 227, 159 (1974).

42) RAETIG, H.: Tierexperimente zur oralen Immunisierung
mit inaktiviertem Antigen. Zbl. Bakt. Hyg. 1. Orig. 182,
525 (1961).

43) -- -- : Die lokale Immunisierung mit inaktiviertem
Antigen gegen bakterielle Darminfektionen (Typhus, Paratyphus,
Cholera, Ruhr). Zbl. Bakt. Hyg. 1. Abt. Ref. 183, 427 (1962)

44) -- -- : Provokation einer Infektion durch Schutz-
impfung. 8. Mitteilung: Vermeidung der Provokation durch lo-
kale Anwendung des Antigens. Zbl. Bakt. Hyg. 1. Orig. 187,
366 (1962).

45) -- -- : Tierexperimente zur Durchlässigkeit des In-
testinaltraktes für Viren. Zbl. Bakt. Hyg. 1. Orig. 191, 97
(1963).

46) -- -- : Tierexperimente zur Resorptionsvirämie. Zbl.
Bakt. Hyg. 1. Orig. 192, 524 (1964).

47) -- -- : Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen
Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 1. Mitteilung: Der

Grundversuch zur Schutzimpfung der Maus gegen eine Enteritisinfektion. Zbl. Bakt. Hyg. 1. Orig. 193, 398 (1964).

48) -- -- : Orale Immunisierung mit

2. Mitteilung: Experimente zur unspezifischen Schutzimpfung bei der Enteritisinfektion der Maus. Zbl. Bakt. Hyg. 1. Orig. 197, 368 (1965).

49) -- -- : Neue Modellversuche zur Infektabwehr des Darmes. Zbl. Bakt. Hyg. 1. Orig. 198, 206 (1965).

50) -- -- : Neues zur Wirkungsweise der oralen Immunisierung. Wien. Med. Wschr. 115, 33 (1965).

51) -- -- : Provokation einer Infektion durch Schutzimpfung. X. Mitteilung: Vermeidung der Provokation einer Virusinfektion durch orale Impfung mit inaktiviertem Virus während der Inkubationszeit. Zbl. Bakt. Hyg. 1. Orig. 200, 448 (1966).

52) -- -- , A. BUSE: Orale Immunisierung mit

4. Mitteilung: Serumantikörper der Maus nach spezifischer Impfung gegen Salmonellenenteritis. Zbl. Bakt. Hyg. 1. Orig. 204, 221 (1967).

53) -- -- , -- --: Orale Immunisierung mit

10. Mitteilung: Serologische Primär- und Sekundärantwort nach oraler Impfung mit *S. typhi* murium-Vollantigen im vergleichenden Tierexperiment. Zbl. Bakt. Hyg. 1. Orig. 214, 216 (1970).

54) -- -- : Die orale Impfung mit inaktivierten Mikroorga-

nismen. Zehn Jahre Forschungsarbeit im Robert Koch-Institut.
Bundesgesundheitsblatt 14, 141 (1971)

55) RASCHE, B., I. MARCIC, W.F. FLAHER: Zusammensetzung des
Bronchialschleimes bei langfristig vorbehandelter chronisch
obstruktiver Bronchitis und bei unvorbehandelter Bronchitis
in Abhängigkeit von der Therapie. Pneumol. 146, 321 (1972).

56) -- -- , -- -- , -- -- : Nasale und intratracheale
Immunisierung mit einem Vakzine-Präparat bei chronisch obstruk-
tiver Bronchitis. Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 23, 553 (1973).

57) RAUSS, K., J. KETTYI: Serum- and coproantibodies in mice,
immunized perorally with Shigella flexneri. Zschr. Immunforsch.
127, 37 (1964).

58) RYTEL, M.W., J.L. SCHULMANN: Protection of mice against
aerosoltransmitted influenza A₂ virus infection by stimulation
of interferon. J. gen. Virol. 5, 429 (1969).

59) RODEGRA, H.: Immuntherapie im INO-Bereich. Ärztl. Praxis. 26,
1022 (1974).

60) SALM, E.: Sekretion von T₃-Phagen als Modellvirus in den
Magen der Maus nach intravenöser Injektion. Inaug. Diss. FU
Berlin 1968.

61) SANARELLI, G.: Sur les vaccinations par voie nasal. Zbl.
Bakt. Hyg. Ref. 79, 344 (1925).

62) SCHIEBLE, W.: Über die Vorgänge bei der Inhalation von Aerosolen in der normalen Lunge. Zschr. Aerosolforsch. Ther. 2, 364 (1953).

63) SC. LEWINSKI, E., N. GRABEN, J. FUNK, E. SAIM, H. RAETTIG: Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 13. Mitteilung: Persorption und Sekretion von Mikroorganismen im Tierversuch. Zbl. Bakt. Hyg. 1. Abt. Orig. A 218, 93 (1971).

64) SCIMUDDE, R.: Vergleichende orale, nasale und rektale Impfung von Mäusen mit inaktivierten *S. typhi murium*-Bakterien mit und ohne Zusatz von Dimethylsulfoxid-Zugabe. Inaug. Diss. FU Berlin 1968.

65) SCHULZE, H.J.: Einfluß der oralen Immunisierung auf die Phagozytosefähigkeit der Peritonealmakrophagen der Maus. Inaug. Diss. FU Berlin 1972.

66) SCHULZE, H.J., CH. JASCHINSKI, H. RAETTIG: Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 17. Mitteilung: Zeitkinetik der unspezifischen Phagozytoseaktivität von Peritonealmakrophagen. Zbl. Bakt. Hyg. 1. Abt. Orig. A 225, 273 (1973).

67) SLAYEGANI, M., F.S. LIEF, S. MUDD: Specific and nonspecific cell-mediated resistance to influenza virus in mice. Infect. Immun. 9, 991 (1974).

68) SIEGENTHALER, W.: Klinische Pathophysiologie. Thieme Verlag
Stuttgart 1970, 420.

69) SPRENGER, F.: Die lokale Immunisierung. Ther. Wo. 24,
4325 (1974).

70) STINEBRING, W.R., J.S. YOUNGMER: Patterns of interferon
appearance in mice injected with bacteria or bacterial endo-
toxin. Nature 14, 712 (1964).

71) TOMASI, T.B., S. ZIGELBAUM: The selective occurrence of γ A
globulins in certain body fluids. J. Clin. Invest. 42,
1552 (1963).

72) SZABO, S., B. RASCHE, E. MODY: Untersuchungen über die
serologische Aktivität der Immunglobuline des Bronchialschleims
bei chronisch obstruktiven Atemwegserkrankungen. Pneumol.
149, 1 (1973).

73) UECKER, W., M. MEVES, H. RAETTIG: Orale Immunisierung
mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Anti-
genen. 6. Mitteilung: Tierversuche zur Resorption und Sekre-
tion von radiomarkiertem bakteriellem Antigen. Zbl. Bakt. Hyg.
1. Orig. 208, 2 (1968).

74) VOLKHEIMER, G.: Das Phänomen der Persorption. Ärztl. Prax.
21, 3711 u. 3731 (1969).

75) VOSS, H.: Virus und Polyelektrolyte. II. Mitteilung: Die

Bedeutung der Polyelektrolyte für die Abwehr antigenwirksamer Substanzen. Zbl. Bakt. Hyg. 1. Orig. 193, 1 (1964).

76) WALDMAN, R.H., J.A. KASEL, R.V. FULK, Y. TOGO, R.B. KORNICK, G.G. HEINER, A.T. DAWKINS Jr., J.J. MANN: Influenza antibody in human respiratory secretions after subcutaneous or respiratory immunization with inactivated virus. Nat. 218, 594 (1968).

77) WALDMAN, R.H., J.J. MANN, P.A. SMALL Jr.: Immunization against influenza. JAMA 207, 520 (1969).

78) WALDMAN, R.H., S.H. WOOD, E.J. TORRES, P.A. SMALL Jr.: Influenza antibody response following aerosol administration of inactivated virus. Am. J. Epid. 91, 575 (1970).

79) WALDMAN, R.H., F.H. WIGLEY, P.A. SMALL Jr.: Specificity of respiratory secretion antibody against influenza virus. J. Immunol. 105, 1477 (1970).

80) WALDMAN, R.H., C.S. SPENCER, J.E. JOHNSON III: Respiratory and systemic cellular and humoral immune response to influenza virus vaccine administered parenterally or by nose drops. Cell. Immunol. 3, 294 (1972).

81) WALDMAN, R.H., W.J. COGGINS: Influenza immunization: Field trial on a university camp. J. Infect. Dis. 126, 242 (1972).

82) WALDMAN, R.H., P.F. JURGENSEN, G.N. OLSEN, R. GANGULY, J.E. JOHNSON III: Immune response of the human respiratory

tract. I. Immunglobulin levels and influenza virus vaccine antibody response. J. Immunol. 111, 38 (1973).

83) WALDMAN, R.H., R. GANGULY: Immunity to infection on secretory surfaces. J. Infec. Dis. 130, 419 (1974).

84) v. WASSERMANN, A., J. CITRON: Über die Bildungsstätten der Typhusimmunkörper. Zschr. f. Hyg. 50, 332 (1905).

85) WERNER, H.J., H. LEFEVRE, H. RAETIG: Biphasic occurrence of IgM-forming cells in the intestine after oral immunization. Nat. 232, 119 (1971).

86) WERNER, H.J.: Die Anwendung einer Inhalationsimpfung bei chronischer Bronchitis des Menschen und ihre immunologische Wirkung. Prax. Pneumol. 28, 846 (1974).

87) YOSHIDA, E.: Über Immunisierung per os. Arch. f. Hyg. 69, 21 (1909).

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. med. H. Raettig für die freundliche Überlassung des Themas. Frl. Jaschinski und Frau Schubert danke ich für ihre Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

Lebenslauf

Am 11. 12. 1944 wurde ich als zweites von drei Kindern des Ingenieur Richard Walter und seiner Ehefrau Else Walter in Erlangen geboren. Nach dem Besuch der Volksschule in Nürnberg-Mögeldorf von 1951 - 1955 und des humanistischen "Neuen Gymnasiums Nürnberg" von 1955 - 1965 studierte ich anschließend 1 Semester Germanistik an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen und 3 Semester Pädagogik an den Pädagogischen Hochschulen in Nürnberg und Berlin. Im Wintersemester 1967/68 bekam ich die Zulassung zum Medizinstudium an der Freien Universität Berlin. Dort bestand ich im Oktober 1970 das Physikum und im Februar 1974 das Staatsexamen. Ab dem 1.4.1974 war ich für 4 Monate als Medizinalassistent in der II. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses Am Urban in Berlin-Kreuzberg und anschließend für 4 Monate in der I. Chirurgischen Abteilung des gleichen Hauses. Die "freie Zeit" der Medizinalassistentenzeit leistete ich von Dezember bis März im Robert Koch-Institut in Berlin ab. Seit dem 1. 5. 75 bin ich als Assistenzarzt in der Inneren Abteilung des Bethanienkrankenhauses in Moers beschäftigt.

